

From the Genetics and Plant Breeding Research Institute, Ottawa

THE MONOSOMIC ANALYSIS OF GROWTH HABIT IN WINTER WHEAT*

By

J. W. MORRISON

With 1 Figure in the Text

(Received April 7, 1960)

Introduction

In F_1 hybrids between winter and spring varieties, spring habit is dominant and segregation for winter and spring types occurs in the F_2 . Several experiments have been performed and hypotheses of one, two or three genes proposed to govern habit of growth in wheat (see AUSEMUS 1956; DANTUMA 1958; KNOTT 1959). As pointed out by HAYES *et al.* (1955) the ratios obtained are dependent upon when the heading data are taken because some F_2 plants head early in the summer and more continue to head as the season progresses.

Entirely new and more effective methods for studying gene behaviour in the polyploid bread wheats have been possible since the development of the aneuploid series by Dr. E. R. SEARS. The full series of monosomics, nullisomics, trisomics, and tetrasomics have been obtained in the variety Chinese Spring (SEARS 1939, 1944, 1954). UNRAU (1950) was one of the first to use the series for studying growth habit. He reported that the variety Hymar has a winter-habit gene on chromosome IX and that Chinese Spring has a gene for spring habit on that chromosome. More recently JENKINS and KUSPIRA (reported by SEARS 1959) have shown that chromosome XVIII of the variety Kharkov has a gene for winter habit. KUSPIRA and UNRAU (1957) have shown that Thatcher has genes for growth habit on chromosome XVIII and XIII. KNOTT (1959) suggested that Gabo has genes for winter habit on chromosomes IX and XVIII and Chinese has a gene on XIV. Some of the monosomic lines of Chinese Spring were used by WIENHUES (see RUDORF 1955) in crosses with the variety HEINE'S VII to study growth habit but no report has dealt with the subject at any length.

This paper is the report of an experiment in which three winter wheat varieties were crossed with the monosomic lines of Chinese Spring in order to study the genes for growth habit and to demonstrate differences or similarities among the varieties.

Materials and Methods

The monosomic lines of *T. vulgare* used in this study are from the variety Chinese Spring and are the progeny of some of the original material released by Dr. SEARS. They were used for a previous study (MORRISON 1953) and have been carefully maintained. The seed of the three winter varieties came from plots planted especially to ensure purity of type. The varieties are: Cornell 595 C.A.N. 2486; Kharkov M.C. 22 C.A.N. 2360; and Kanred.

Each of the 21 monosomic lines of Chinese Spring was crossed with the three varieties, with the monosomics used as females. Most of the progeny were aneuploids but as parental

* Contribution No. 19 from the Genetics and Plant Breeding Research Institute, Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa.

monosomics also produce gametes with 21 chromosomes, a cytological examination was necessary to distinguish between monosomic ($2n = 41$) and disomic ($2n = 42$) F_1 plants. When the primary tiller reached a stage of development such that meiosis was occurring in the pollen mother cells of the spike, it was removed from the plant and the head fixed and stored for cytological study. Unless otherwise indicated, this sampling date was used throughout this experiment as a measure of the development of the plants. It is closely correlated with the heading date or data on anthesis. In this experiment such a procedure was thought to be more reliable than using heading data because one or more tillers had to be removed for cytological purposes.

Whole spikes were fixed in CARNOY's fluid 6:3:1 and examinations made from aceto-carmin squashes. Cells at metaphase I or anaphase I were studied because it was essential to know if fragment or extra chromosomes were present.

Greenhouse test of F_1 plants

Five to eight F_1 seeds of each cross were planted in pots in the greenhouse in January 1955. The plants received some supplementary light and were given nutrient solution. The temperature in the house fell to 50° F or lower on some very cold nights and fluctuations higher than 70° occurred on some bright days. The following crosses were not successful or produced only disomic plants and are therefore not considered in this test: I × Kanred; XII × Kharkov; II, VIII, and X by Cornell, Kharkov, and Kanred.

Field test of F_1 plants

The remaining crosses that had been missed were completed in the growth chamber in the winter. In May the F_1 seeds of these crosses along with reserve seeds from the previous crosses were planted in the field. Growing conditions were good for the first month but later the plants suffered from drought and then were further weakened by a rust epidemic. Sampling data are therefore somewhat unreliable.

Field test of the F_2

F_2 seeds from monosomic F_1 plants were space-planted in the field in May, 1956. No seeds from monosomic plants were available for II × Cornell and Kharkov, and XII × Kharkov and only a few seeds were viable from the crosses VIII and II × Kanred. Some rows of IX × Kanred (fragment), check rows of parental varieties and disomic plants from crosses of the monosomics by the winter wheats were also grown. Germination was poor but growing conditions for the year were excellent.

Growth chamber trials

The first experiment was designed to test the reaction of the plants under constant temperature. Reserve F_1 seeds of some crosses were planted in pots and grown to maturity in the growth chamber where the temperature was constant at 70° F \pm 2°. A light intensity of approximately 2000 ft. candles was supplied by fluorescent tubes for 18 hours a day. For the remaining six hours the plants received light from two 100 watt incandescent bulbs. Nutrient solutions were given once a week.

The second experiment tested the reaction of the plants to periods of cold treatment, at temperatures known to cause vernalization. Seeds were germinated in pots at 70° and then given six weeks cold treatment at 35°. The seeds of a second treatment were germinated three weeks after the first lot of seeds and then put into the cold room. Two weeks later another lot of seed was germinated and also put into the cold room. The cold treatments were therefore started on successive dates but all plants were transferred back into one room at 70° on the same day and then grown until heading. At 35° there was no noticeable growth of seedlings. When the pots were moved into the warm growing room, all the seedlings were at the two-leaf stage and uniform in size.

A test of some of the monosomics of Chinese Spring was made under controlled conditions in the growth chamber. This experiment, which included as checks the varieties Saunders, Chinese Spring, and Cornell, was also designed to study the effect of a vernal temperature on monosomic IX and XVIII. These seedlings were given a cold treatment at 35° for three weeks.

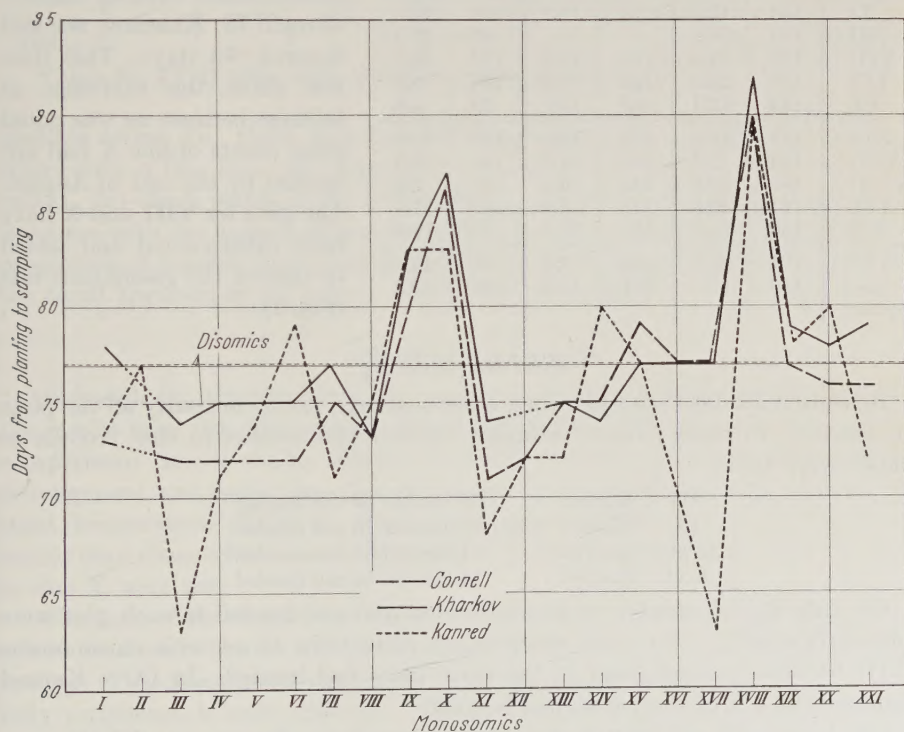
Results

Greenhouse test of
 F_1 plants

The first three plants were sampled after 60 days. Two of these plants were from III \times Kanred and one was from IX \times Kanred. The plants of III \times Kanred were monosomics, the plant in IX \times Kanred was also aneuploid with 41 chromosomes plus a fragment. The last plants to produce flowering tillers were monosomics of XVIII \times Kharkov and XVIII \times Kanred. They were sampled a month later

Table 1. Average number of days from planting to the sampling date, when the F_1 plants were grown in the greenhouse

Monosomic line	Cornell		Kharkov		Kanred	
	No. of plants	Average no. of days	No. of plants	Average no. of days	No. of plants	Average no. of days
I	6	73	3	78	—	—
III	6	72	5	74	5	63
IV	5	72	6	75	7	71
V	7	72	6	75	7	74
VI	5	72	5	75	3	79
VII	7	75	7	77	7	71
IX	8	80	7	83	3	83
XI	4	71	4	74	6	68
XII	8	72	—	—	3	72
XIII	6	75	5	75	5	72
XIV	7	75	7	74	7	80
XV	3	79	3	77	3	77
XVI	7	77	5	77	4	77
XVII	5	77	5	77	6	63
XVIII	7	90	6	92	7	90
XIX	5	77	6	79	5	78
XX	6	76	7	78	5	80
XXI	7	76	6	79	4	72
Disomics	20	75	21	77	21	77

Fig. 1. No. of days from planting to sampling in the F_1 monosomic lines when grown in the greenhouse (data for VIII and X taken from the field test)

than the first plants, and 96 days after planting (Table 1). A comparison of means is shown in the graph (Fig. 1).

Field test of F_1 plants

The first two plants were sampled 45 days after planting. They were from IX \times Kanred and both had 41 chromosomes plus a fragment. The first monosomics were taken 13 days later. At the end of August some of the plants of crosses

Table 2. *Test of the F_2 in the field; heading count for July 25*

	Cornell		Kharkov		Kanred	
	No. of plants	Headed %	No. of plants	Headed %	No. of plants	Headed %
I	131	19.8	141	10.6	31	22.6
II	—	—	—	—	6	—
III	144	11.8	150	10.0	123	60.2
IV	143	16.1	182	15.4	182	23.6
V	186	18.8	163	14.1	78	16.7
VI	166	21.7	175	13.7	64	14.1
VII	186	16.1	152	25.0	30	10.0
VIII	70	17.1	44	15.9	10	10.0
IX	140	23.6	131	8.4	98	25.5
X	130	11.5	77	3.9	161	15.5
XI	104	13.5	88	10.2	133	26.3
XII	132	28.8	—	—	44	27.3
XIII	179	24.0	154	18.2	172	26.7
XIV	166	29.5	184	22.8	176	9.7
XV	149	12.1	184	19.0	20	5.0
XVI	178	18.5	189	19.0	128	12.5
XVII	144	22.2	161	24.2	152	96.1
XVIII	167	0.0	143	0.0	127	0.0
XIX	141	29.8	143	18.9	143	21.7
XX	159	18.2	154	22.8	70	11.4
XXI	171	25.7	154	8.4	68	48.5
Chinese Spring	159	17.0	171	14.0	166	19.3

with monosomic XVIII and a few of those with monosomic X still had not produced flowering tillers. These plants headed later in the greenhouse and proved to be monosomics. In line VI, where five plants of each cross had been grown, hybrids with Kanred were eight days later than those with Cornell. The plants from crosses with chromosome X were late and the averages for sampling of ten monosomics in each cross were as follows: Cornell, 78; Kharkov, 80; and Kanred, 73 days. This does not show the extremes of lateness because as was noted some plants of line X had not headed by the end of August. The data for VIII and X have been extrapolated and added to that of the greenhouse test (Fig. 1).

Field test of the F_2

By July 9, 52 days after planting, a few scattered plants in nearly all the plots had headed. In some plots a sufficient number had headed so that records as follows were taken:

III \times Kanred	64 headed 59 not headed
IX \times Kanred (frag.)	67 headed 76 not headed
XVII \times Kanred	91 headed 61 not headed
XXI \times Kanred	14 headed 54 not headed

On July 25 the number of plants headed and not headed in each plot were counted (Table 2). The most conspicuous plots were those with chromosome XVIII because not one plant in the three plots had headed. In IX \times Kanred (fragment) 93.4% of the plants had headed.

On August 27, all the plants except those from chromosome XVIII were pulled and classified as being: 1. headed or spring types; 2. winter plants; 3. inter-

Table 3. *Test of the F_2 in the field; heading count for August 27*

	Cornell			Kharkov			Kanred		
	Winter plants %	Inter-mediate %	Headed %	Winter plants %	Inter-mediate %	Headed %	Winter plants %	Inter-mediate %	Headed %
I	31.3	7.6	61.1	46.8	10.6	42.6	35.5	16.1	48.4
II	—	—	—	—	—	—	83.3	—	16.7
III	36.1	13.9	50.0	39.3	17.3	43.3	2.4	2.4	95.1
IV	31.5	16.1	52.4	41.8	13.7	44.5	23.6	9.9	66.5
V	37.6	9.7	52.7	42.9	16.6	40.5	35.9	21.8	42.3
VI	35.5	5.4	59.1	36.6	18.3	45.1	42.9	17.5	39.6
VII	37.6	15.6	46.8	37.5	18.4	44.1	33.3	16.7	50.0
VIII	50.0	11.4	38.6	50.0	13.6	36.4	40.0	—	60.0
IX	42.9	12.8	44.3	64.9	10.7	24.4	39.8	13.3	46.9
X	54.5	10.0	35.4	63.6	11.7	24.7	49.7	6.8	43.5
XI	38.5	15.4	46.1	40.9	18.2	40.9	26.3	5.3	68.4
XII	30.0	6.8	62.9	—	—	—	18.2	2.3	79.5
XIII	24.0	11.7	64.3	33.2	13.6	53.2	28.5	7.0	64.5
XIV	26.5	6.3	66.9	32.1	9.8	58.1	33.5	12.0	54.5
XV	38.2	14.8	47.0	41.3	12.0	46.7	45.0	20.0	35.0
XVI	38.2	8.4	53.4	38.1	14.3	47.6	43.8	15.6	40.6
XVII	35.4	9.7	54.9	31.0	7.5	61.5	0.7	—	99.3
XVIII*	86.2	7.8	6.0	82.5	11.2	6.3	92.1	3.1	4.8
XIX	26.2	4.3	69.5	37.1	9.1	53.8	26.6	8.4	65.0
XX	34.0	17.6	48.4	28.0	12.3	59.7	61.4	12.9	25.7
XXI	36.8	10.0	53.2	51.9	16.2	31.9	11.7	1.5	86.8
Chinese Spring	37.1	17.6	45.3	40.3	16.4	43.3	40.4	13.2	46.4

* Data for XVIII taken when plants were pulled on September 24.

mediate forms, i.e., those that had heads partially out or in the boot stage, or tillers with a flag leaf. On September 24, the plants in lines XVIII were also pulled. No check plants of the three winter varieties had headed. In Table 3 the five lines with the highest proportion of winter types and the five with the lowest proportion of headed types in each variety are in bold face. With few exceptions, the trend apparent in the counts on July 25 was upheld.

Growth chamber trials

Although the number of plants was small, being limited by space available, the results from the three growth chamber trials were fairly consistent and some comparisons can be made. Plants of Cornell headed in four months and this development was faster than Kanred under the conditions of long day and constant temperature (Table 4). The monosomic hybrids with Cornell were also earlier than those with Kanred. Hybrids with chromosome IX were late but those in line X were not.

The data of the second test (Table 5) show that Chinese Spring responded to a cold treatment but to a different degree from Kharkov, a true winter wheat variety. The delay in development of hybrids with chromosome XVIII, unless fully vernalized, is quite obvious. The six weeks treatment converted all monosomic hybrids but three weeks did not. The conversion of the plants to a spring habit of growth can be compared to the reaction of a typical spring wheat,

Saunders, as shown in Table 6. In this third trial all monosomics of Chinese Spring that were tested were speeded up by the cold treatment. The lateness of IX and especially XVIII is emphasized in the growth chamber. In field trials of the same monosomics grown in the summer, plants of line IX and XVIII were

one week later than other monosomics.

Table 4. *Average number of days from planting to the sampling date, when the F_1 plants were grown in a growth chamber at 10° F constant temperature and given a day length of 18 hours*

	Cornell		Kharkov		Kanred	
	No. of plants	Average no. of days	No. of plants	Average no. of days	No. of plants	Average no. of days
VI	—	—	4	69	3	67
VIII	4	59	4	72	—	—
IX	4	73	3	76	3*	71
X	1	67	2	74	4	64
XI	4	58	4	71	3	62
XIV	4	64	1	74	4	71

Disomic checks:

Chinese Spring 3 plants 66.

Cornell 3 plants 117.

Kanred 3 plants. No tillers with flag after 125 days.

* One plant with 41 chromosomes plus a fragment was extremely early, sampled after 42 days.

location was not observed in the Kanred hybrids where the usual pairing was $20^{II} 1^I$.

In hybrids of IX × Kanred (fragment) the fragment sometimes paired with its homologous partner giving $20^{II} 1^I 1^I$ or 21^{II} . At first the fragment was taken

Table 5. *Average number of days from the end of cold treatment to the sampling date, when the F_1 plants were given a cold treatment and then grown at 70° F in a growth chamber*

	6 weeks cold		3 weeks cold		1 week cold		No cold	
	No. of plants	Average ¹ no. of days	No. of plants	Average no. of days	No. of plants	Average no. of days	No. of plants	Average no. of days
XVIII × Cornell	3	37	2	59, 65	3	78, 89, 50*	2	95, 97
XVIII × Kharkov	3	33	3	61, 74, 41*	3	89	3	96, 56*, 61*
XIX × Cornell	3	29	3	32	3	44	3	47, 47.54*
XIX × Kharkov	3	30	3	36	3	52	3	54
<i>Disomic checks</i>								
Chinese Spring	2	27, 29	2	31, 33	2	41, 42	2	57, 66
Kharkov	2	63, 81	2	117, 118	2	128, 128	2	128, 130

¹ Actual number when more than one figure is given.

* Disomic plants, 42 chromosomes.

to be a telocentric but with closer study some uncertainty arose. The possibility of an iso-chromosome cannot be excluded but there did not appear to be any definite internal pairing in the fragment. At anaphase the fragment was not as long as the long arm but longer than the short arm of chromosome IX.

Discussion

In tests under controlled conditions Chinese Spring, a spring variety, responded to a vernalization treatment of cold temperature. In trials at Ottawa (GFELLER unpublished) other spring wheat varieties responded to a cold or short day treatment and developed faster than check plants grown at a constant temperature. With some varieties, the duration of the treatment was as short as one week, others responded most readily after three weeks vernalization. Quite analogous results have been obtained by DANTUMA (1958). The proportion of plants that will head in an F_2 of a cross of winter by spring wheats depends then a great deal on the basic reaction of both varieties and upon the conditions in which the plants are raised. Previous workers have shown that in the F_2 of crosses between winter and spring wheats there is a wide range of early and late plants with no definite dividing line between lateness and winter-growth habit. The present study of monosomic F_1 hybrids under various conditions clearly indicates that unless partial vernalization (either in response to cold or light) is considered, much of the value of the test is lost. It also makes certain aspects of the problem quite clear. All winter plants will head under prolonged growing conditions in a growth chamber or greenhouse. Therefore under artificial conditions winter habit is expressed as lateness, whereas in the field, winter habit may mean the failure of plants to head. Late spring plants may be stimulated by a cold treatment or a short day; prolonged growth in winter plants has an influence equivalent to vernalization. The interrelationship of lateness and winter habit is thus established. Similarly, earliness and spring habit can be equated. This is somewhat of an over-simplification of the problem as will be shown in the discussion under certain chromosomes because along with general lateness or earliness is another value, a threshold value, which once reached can greatly alter the response of the plants.

Chromosome XVIII

The presence of a gene (or genes) for winter-growth habit on chromosome XVIII of Cornell, Kharkov, and Kanred has been firmly established by this experiment. Further, in view of the behaviour, the gene must be considered as *the major gene* of growth habit because the effect produced by this gene was greater than that of any other. In the greenhouse the monosomic F_1 plants were 2—3 weeks later than disomics; in the field test some of them did not head. The F_2 plants were all extremely late, 94% remained winter type even after a prolonged growing season (Table 3). Just how important this gene is to winter habit is shown by the response to vernalization of six weeks and three weeks cold (Table 5). The F_1 plants grown in the greenhouse probably received adequate vernalization by the cold temperature and low light combined with slow growth during January, February, and March.

Chromosome XVIII of Chinese Spring also has considerable influence on growth habit (SEARS 1954). Other reports have shown that chromosome XVIII plays a major role in determining growth habit of Kharkov, Thatcher, Gabo, Hope, Hymar, and Timstein. KUSPIRA and UNRAU (1957) suggested that Chinese Spring carries a dominant spring habit gene on XVIII. This hypothesis would

explain the earliness of the disomic hybrids between winter varieties and Chinese Spring monosomics. However, the expression of chromosome XVIII is not true spring habit because these particular monosomics are much later than all others. Further, a cold treatment of three weeks speeds up the development of monosomics in XVIII of Chinese Spring by 40—50 days (Table 6). Therefore, the gene must also be considered, at least partially, as a winter-habit gene, or more specifically a gene governing cold requirement.

This hypothesis is sufficient to explain general lateness or earliness and differences between varieties requiring one or three weeks vernal treatment but there are some varieties, e.g., Saunders, which show no response to vernalization.

Table 6. *Average number of days from planting to the sampling date, when some monosomics of Chinese Spring, with and without cold treatment, were grown in the growth chamber at 70° F*

	No cold treatment		With cold treatment for 3 weeks	
	No. of plants	Average no. of days	No. of plants	Average no. of days
<i>Chinese Spring monosomic plants</i>				
II	5	58	—	—
XII	5	57	—	—
IX	5	67	3	44
XVIII	4	88	3	36
XIX	3	51	3	40
<i>F₁IX × Cornell . . .</i>	5	76	4	64
<i>Disomic Plants</i>				
Chinese Spring . .	5	58	5	32
Saunders	5	28	5	26
Cornell	—	117*	—	117*

* Only three of these plants were saved to determine this date.

This opens up a new avenue of discussion, that of dose relation. With one chromosome XVIII of Chinese Spring the plants are late; two doses cause normal maturity, either as a disomic or in a mono-isochromosome (SEARS 1954). The influence of one extra chromosome is not very great although by increasing the number of genes we do get somewhat earlier plants as SEARS has shown with tetrasomics. It seems therefore that there is no dosage level for critical expression but some slight dosage effect once the threshold level is reached.

Chromosome X

The second most important chromosome of the winter varieties on which there are genes for growth habit is chromosome X. In the summer test of the *F*₁, some of the plants did not head. Further, the *F*₂ data show that plants were late or had a preponderance of winter types (Table 3). The extrapolated data in the graph indicate there are some differences in potency between the three varieties, and this is confirmed by results of the *F*₂ where the gene appears to be stronger in Kharkov and Cornell than in Kanred. Some information about the nature of gene action in this chromosome is given by the results of the experiment in which

This then is true spring growth habit or nonrequirement of vernalization. We see then that a threshold value must be the controlling factor for growth habit. When the critical unit of the gene is present, plants require no vernalization and development is normal. If less than the critical unit is present then development is late. Vernalization can compensate for the inactive or absent part of the gene complex and make development normal.

the plants received continuous light (Table 4). Monosomics of $X \times$ Kharkov were late as expected but those of $X \times$ Kanred were not. Presumably plants of $X \times$ Kanred reacted to the light stimulus. This would possibly explain some of the discrepancies in the summer test of the F_1 where some plants of $X \times$ Kanred were as early as hybrids with chromosome IX. Some varieties of wheat, Mediterranean wheat, require a period under short day length before they head. The response of these plants to light vernalization (see reviews of MURNEEK and WHITE 1948; DANTUMA 1958) is a well known phenomenon.

Chromosome IX

The results for this chromosome are not as consistent as for others but nevertheless the trend is positive. In the F_1 test in the greenhouse, monosomic hybrids were late; in the summer test the reaction was variable but generally late; and under constant temperature all hybrids with chromosome IX were later than those with chromosome X. In the field, the reaction of F_2 plants of $IX \times$ Kanred and $IX \times$ Cornell was less convincing than $IX \times$ Kharkov (Table 3).

It is very likely that this gene is again complex, much like the one of chromosome XVIII, and that there may be a variable reaction from one variety to another. UNRAU (1950) found a gene for winter habit in IX of Hymar and also in Thatcher (personal communication). KNOTT (1959) indicated that Gabo has a gene for winter habit on chromosome IX. Monosomics of IX in Chinese Spring are late and the variety Hope carries growth factors in IX (SEARS 1954). MACKEY (1954) considers that IX is the important chromosome for spring and winter habit of growth in Swedish wheats. WIENHUES (RUDOLF 1955) did not observe any difference in hybrids with HEINE's VII when tested with chromosome IX. The very fact that some authors consider this chromosome as having growth-promoting genes and others consider the genes are essential for winter habit, indicates a behaviour analogous to chromosome XVIII. It would appear therefore that the typical reaction of any variety depends upon what part of the gene complex is present. As a further similarity, the gene in IX reacts to a cold vernal treatment (Table 6) but somewhat less than does XVIII.

An interesting aspect of dosage relation is revealed in the plants carrying a fragment of chromosome IX. The F_1 plants of $IX \times$ Kanred (fragment) were very early in the greenhouse test, early in the field test and in the growth chamber. By August 27, in the field test of the F_2 plants, all 143 F_2 plants had headed. This earliness — not only lack of winter habit but also an increase in earliness — and the head types produced are inconsistent with the present knowledge of gene action in chromosome IX as discussed by MACKEY (1954) and SEARS (1954).

Other chromosomes

Because the trial of the F_1 in the greenhouse was under fairly uniform conditions all deviating results in this test have been compared with summer trials. There was no evidence in the F_2 to substantiate any genes for lateness or winter habit in chromosome I of Kharkov. Hybrids of $VI \times$ Kanred were late in both the greenhouse test and the field test. The F_2 data again indicated a gene on chromosome VI of Kanred which influences growth habit and from the test in the growth

chamber perhaps it responds to light similarly to that shown in chromosome X. Monosomic hybrids of XIV \times Kanred were late and somewhat less vigorous than other plants of the test in the greenhouse. In subsequent trials the results for this chromosome are not consistent enough to be conclusive. There is little support for the hypothesis (KNOTT 1959) that XIV has a major gene for winter growth. In the F_2 of XX \times Kanred, 60% of the plants had not headed on August 27 (Table 3). This was the second highest proportion of winter plants. This support of the F_1 data makes it reasonable to assume that chromosome XX of Kanred carries genes affecting winter habit. From the consistent reaction in XXI \times Kharkov it would appear that there is some gene action here for winter habit or lateness that is not present in Cornell or Kanred.

Chromosomes in early lines

There are some chromosomes of Kanred that have a strong effect on earliness. Two of them, III and XVII, must carry genes for early maturity because plants were early in both the F_1 and F_2 tests. In the F_2 , hybrids of XXI \times Kanred were again early — 86.8% had headed. Therefore, chromosome XXI of Kanred has a gene influencing early growth (spring habit). The results for chromosome VIII and XI are rather inconsistent but there is some indication of earliness in hybrids with all three winter varieties.

Summary

1. A study of growth habit was made in the monosomic and disomic hybrids between the aneuploid lines of the spring wheat Chinese Spring and three winter wheat varieties, Cornell, Kharkov, and Kanred. The major test of the F_1 was made in a greenhouse with additional tests made in the field, in a growth chamber under constant temperature, and in the growth chamber after a vernalization treatment of cold temperature.

2. In the F_1 , spring habit was dominant over winter habit and disomic hybrids ($2n = 42$) had normal spring growth. Monosomic hybrids ($2n = 41$) having the chromosome of the winter variety but not the corresponding chromosome of the aneuploid line of Chinese Spring showed varying degrees of spring or winter habit, depending upon the chromosomes involved and in some cases upon the winter wheat variety.

3. The F_2 , grown from monosomic F_1 plants, was examined for the number of plants headed on two different dates and finally all plants were pulled and rated as spring type (headed), intermediate, and winter. All the major differences and most of the minor differences in growth habit, between the monosomic and the disomic hybrids, shown by the F_1 test were substantiated in the F_2 test.

4. Major and minor effects for retarding growth (lateness = winter habit) or accelerating it (earliness = spring habit) were indicated for several chromosomes. While it was possible to associate growth factors with specific chromosomes it was not possible to determine whether the growth habit was under the control of several independent genes on one chromosome or whether a complex gene exists.

5. The most important gene for winter-growth habit was demonstrated on chromosome XVIII of all varieties. Somewhat less potent but equally complex genes for lateness or winter habit were found on chromosomes X and IX. The

genes on chromosomes XVIII and IX responded to a vernal treatment of cold temperature and the gene chromosome X gave some response to a light stimulus. In addition, chromosome VI, XIV, and XX of Kanred, and XXI of Kharkov probably have genes for some slight effect towards lateness or winter habit.

6. In Kanred, genes for earliness were apparent on chromosomes III and XVII and to a lesser degree also on chromosome XXI. For both earliness and lateness some chromosomes showed inconsistent reactions.

Acknowledgement. I would like to acknowledge the assistance, advice and co-operation of Mr. F. GFELLER in many aspects of this research.

References

- AUSEMUS, E. R.: Weizen. II. Wheat in North American. In Handbuch der Pflanzenzüchtung. Bd. 11, S. 187—216. 1956.
- DANTUMA, G.: Breeding wheat and barley for winter hardiness. Ph. D. thesis of the Agr. University, Wageningen, Holland, 1958.
- HAYES, H. K., F. R. IMMER and D. C. SMITH: Methods of plant breeding. New York: McGraw-Hill Co. 1955.
- KNOTT, D. R.: The inheritance of rust resistance. IV. Monosomic analysis of rust resistance and some other characters in six varieties of wheat including Gabo and Kenya Farmer. Canad. J. Plant. Sci. **39**, 215—228 (1959).
- KUSPIRA, J., and J. UNRAU: Genetic analyses of certain characters in common wheat using whole chromosome substitution lines. Canad. J. Plant. Sci. **37**, 300—326 (1957).
- MACKEY, J.: Neutron and X-ray experiments in wheat and a revision of the speltoid problem. Hereditas (Lund) **40**, 65—180 (1954).
- MORRISON, J. W.: Chromosome behaviour in wheat monosomics. Heredity **7**, 203—217 (1953).
- MURNEEK, A. E., and R. O. WHYTE: Vernalization and photoperiodism. Waltham, Mass.: Chronica Botanica Co. 1948.
- RUDORF, W.: Physiologische Grundlagen. Entwicklungsphysiologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. In Handbuch der Pflanzenzüchtung, Bd. 1, S. 225—307. 1955.
- SEARS, E. R.: Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. I. Chromosomal aberrations in the progeny of a haploid of *Triticum vulgare*. Genetics **24**, 509—523 (1939).
- SEARS, E. R.: Cytogenetic studies with polyploid species of wheat. II. Additional chromosomal aberrations in *Triticum vulgare*. Genetics **29**, 232—246 (1944).
- SEARS, E. R.: Nullisomic analysis in common wheat. Amer. Naturalist **87**, 245—252 (1953).
- SEARS, E. R.: The aneuploids of common wheat. Miss. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. **572**, (1954).
- SEARS, E. R.: Weizen. I. The systematics, cytology and genetics of wheat. In Handbuch der Pflanzenzüchtung, Bd. 11, S. 164—187. 1956.
- UNRAU, J.: The use of monosomes and nullisomes in cytogenetical studies of common wheat. Sci. Agric. **30**, 66—89 (1950).

Dr. J. W. MORRISON, Department of Agriculture Research Branch, Experimental Farm,
Morden, Manitoba (Canada)

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln
ÜBER EIN MODELL DER PLASTIDENMUTATION

Von

WILHELM MENKE

(Eingegangen am 12. März 1960)

Erbliche Plastidendefekte können, wie Kreuzungsexperimente zeigen, verschiedene Ursachen haben; die mendelnden Defekte entstehen infolge einer Genmutation, die nicht mendelnden gehen auf extrachromosomale Mutationen zurück. In den Plastiden läßt sich eine extrachromosomale Mutation lokalisieren, wenn sich Zellen finden, in denen normale und mutierte Plastiden nebeneinander vorkommen. Durch Genmutation defekt gewordene Chloroplasten sind nur phänotypisch verändert, während die durch Plastidenmutation entstandenen Defekte unabhängig vom Genom erhalten bleiben. Plastidenmutationen treten wie Genmutationen spontan auf. Sie werden nach einer Zusammenstellung von MALY (1958b) mit einer Häufigkeit von 10^{-4} bis 10^{-3} beobachtet. Bei der immerhin großen Seltenheit des Auftretens einer bestimmten Mutation darf man annehmen, daß jeweils nur eine Plastide mutiert. Aus ihrem genetischen Verhalten muß man folgern, daß die Plastiden besondere Erbanlagen besitzen, deren Gesamtheit man als Plastom bezeichnet¹. Zwischen Genmutation und Plastidenmutationen bestehen jedoch Unterschiede, und von diesen geht die im folgenden entwickelte Auffassung von der Natur der Plastidenmutation und der Wirkungsweise der Plastidengene aus.

Die Häufigkeit der Genmutation kann durch energiereiche Strahlen beträchtlich erhöht werden, während Versuche, durch Röntgenbestrahlung die Rate der Plastidenmutationen heraufzusetzen, erfolglos blieben (MALY 1958b). Dieser Umstand weist darauf hin, daß die dem Genom und die dem Plastom zugrunde liegenden Strukturen verschieden sind. Ferner sind mendelnde Gene entdeckt worden, welche die Mutationshäufigkeit der Plastiden stark erhöhen (RHOADES 1943, ARNASON und WALKER 1949, WOODS und DU BUY 1951). Unter das normale Genom zurückgebracht, behalten die mutierten Plastiden ihren Charakter bei. Sie mutieren nicht zur Ausgangsform zurück. Die geninduzierte Plastidenmutation ist irreversibel und es ist bisher auch kein Fall einer Rückmutation von spontanen Plastidenmutanten bekannt geworden². Von einer Theorie der Plastidenmutation ist also zu fordern, daß sie die Irreversibilität der Plastidenmutation und die Unempfindlichkeit des Plastoms gegen Röntgenstrahlen verständlich macht.

Die phänotypische Beeinflussung der Plastiden durch das Genom kann man sich nach einer mehr und mehr konkretisierenden, aber keineswegs in allen Einzelheiten bewiesenen Vorstellung wie folgt denken. Die Desoxyribonuclein-

¹ Die ältere Literatur wurde von CORRENS kritisch in einem Handbuchartikel zusammengestellt, der nach dessen Tode von F. v. WETTSTEIN vervollständigt und herausgegeben wurde.

² MICHAELIS (1957) hat zwar einen Fall beschrieben, den er als Rückmutation deutet. Es treten jedoch keine Mischzellen mit mutierten und rückmutierten Plastiden auf, während normale und mutierte Chloroplasten in derselben Zelle vorkommen.

säure (DNS) des Zellkerns ist primär Träger der genetischen Information der Zelle. Die Information wird auf hochmolekulare Ribonucleinsäure (RNS) übertragen. Diese wird darauf an die Stellen der Proteinsynthese in der Zelle, also auch in die Plastiden transportiert und ermöglicht in Gemeinschaft mit anderen Komponenten die Synthese der Plastidenproteine¹, die ihrerseits als Fermente die normale Entwicklung der Plastiden zu Chloroplasten und ihre Stoffwechselfunktion gewährleisten. Eine Genmutation ist mit einer Veränderung der chemischen Struktur der DNS verbunden. Diese führt zum Ausfall eines Fermentes und damit zur Blockierung einer Stoffwechselreaktion. Ist dieses Ferment etwa an der Chlorophyllsynthese beteiligt, so vermögen die Plastiden nicht mehr zu ergrünen. Gelingen diese chlorophylldefekten Plastiden wieder unter das normale Genom zurück, so ergrünen sie, weil nunmehr wieder normale RNS in die Plastide gelangt, welche die Synthese der normalen Fermentgarnitur ermöglicht.

Unabhängig davon, ob sich diese Vorstellung von der Genwirkung im einzelnen als zutreffend erweisen wird oder nicht, kann man annehmen, daß die geninduzierte Plastidenmutation in derselben Weise eingeleitet wird wie die reversible, phänotypische Plastidenveränderung, nämlich dadurch, daß die Synthese eines bestimmten Strukturelementes blockiert wird. Da die geninduzierte Plastidenmutation aber irreversibel ist, muß man einen zusätzlichen Mechanismus suchen, der eine irreversible Veränderung der Plastidenstruktur bewirkt. Nun sind Systeme bekannt, in denen die Synthese einer hochmolekularen Verbindung in Anwesenheit von Substrat und Enzym nur dann in Gang kommt, wenn eine geringe Menge des hochmolekularen Reaktionsproduktes als Starter vorhanden ist.

Hier wären als Beispiele die enzymatische Synthese von Amylose und Amylopektin (CORI und CORI 1939) und ferner die enzymatische Synthese der DNS (KORNBERG 1959) anzuführen. Bemerkenswert ist, daß im Falle der DNS-Synthese die zugesetzte DNS nicht nur als Starter die Synthese in Gang bringt, sondern auch die chemische Zusammensetzung des Reaktionsproduktes bestimmt.

Wenn nun infolge einer Genmutation ein Strukturelement der Plastiden, welches die Eigenschaft eines Starters besitzt, nicht mehr gebildet wird, oder wenn seine Produktion hinreichend gehemmt ist, so können bei den folgenden Teilungen Plastiden entstehen, die dieses Strukturelement nicht mehr enthalten. In diesen ist aber die Produktion des betreffenden Strukturelementes auch dann nicht wieder möglich, wenn sie unter das normale, nicht mutierte Genom zurückgelangen. Diese Plastiden sind unter Wirkung eines Gens irreversibel mutiert. Die spontane Plastidenmutation kann ebenfalls als Verlustmutation aufgefaßt werden. In diesem Fall sollte bei den Teilungen gelegentlich spontan eine Tochterplastide entstehen, die ein Strukturelement, welches Startereigenschaften besitzt, nicht enthält. Schon RENNER (1943) hatte die Ansicht geäußert, daß die spontane Plastidenmutation während der größten Reduktion des Plastidenvolums stattfindet. Zweifellos ist in diesem Zustand die Wahrscheinlichkeit, daß bei einer Teilung eine Tochterplastide entsteht, die ein bestimmtes Strukturelement nicht mitbekommt, am größten, weil die Gesamtzahl der überhaupt vorhandenen Strukturelemente dann am geringsten ist. Gestützt wird die Auffassung, daß die spontane Plastidenmutation durch Verlust eines Strukturelementes mit Startereigenschaften zustande komme, durch Hinweise von W. STUBBE (1958, 1959),

¹ Über Proteinsynthese in Chloroplasten: STEPHENSON, THIMANN und ZAMECNIK (1956).

nach denen bei *Oenothera* Defektmutanten der Plastiden nicht durch Genome anderer Arten phänotypisch kompensierbar sind.

Das geschilderte System besitzt offenbar alle Eigenschaften, die man von einem Modell der Plastidenmutation beim derzeitigen Stande des Wissens fordern kann. Es ist wie die geninduzierte Plastidenmutation vom Genom abhängig, und zwar wird die Plastidenmutation von Genen induziert, die Allele von Genen sind, welche die normale Entwicklung der Plastiden ermöglichen. Weil bei den Teilungen der Plastiden solche entstehen, die das fragliche Strukturelement enthalten und solche, die es nicht enthalten, erklärt das Modell, warum die betreffenden mutierten Gene die Mutationshäufigkeit der Plastiden zwar beträchtlich erhöhen, nicht aber die Mutation aller Plastiden bewirken. Wenn ein mutiertes Gen die Vermehrung verschiedener Strukturelemente mit Startereigenschaften hemmt, so können bei den Plastidenteilungen verschiedene Plastidenmutanten in derselben Pflanze auftreten, weil die eine Tochterplastide zufällig das eine, die andere ein anderes Strukturelement nicht mitbekommt, wie es bei *Nepeta* nach DU BUY und WOODS (1951) der Fall zu sein scheint. Das Auftreten von spontanen Plastidenmutationen wird ohne zusätzliche Annahmen verständlich. Verständlich wird ferner, warum die Plastidenmutation irreversibel ist, und warum die Empfindlichkeit des Plastoms gegenüber mutagenen Agenzien eine andere ist als die des Genoms.

Die Frage nach der chemischen Natur des Plastoms läßt sich heute noch nicht beantworten. Zunächst lag es nahe, in Analogie zu den Chromosomen auch in den Plastiden DNS als den Träger ihrer idiotypischen Eigenschaften anzusehen; und so hat es nicht an Bemühungen gefehlt, DNS in den Plastiden nachzuweisen. Negative Befunde (HOLDEN 1952, STÄUBLI 1957, LITTAU 1958) stehen hier positiven gegenüber (METZNER 1952, SPIEKERMANN 1957, MOTHES, BÖTTGER und WOLLGIEHN 1958, STOCKING und GIFFORD 1959).

Aus Blättern von *Antirrhinum majus* Sippe 50 lassen sich nun, wie B. ABEL fand, und wie ich bestätigen kann, Chloroplasten reiner und in besserem morphologischen Erhaltungszustand isolieren als aus irgendeiner anderen von mir untersuchten Pflanze. Diese enthalten nach unseren bisherigen Analysen höchstens soviel DNS, daß ein Molekül vom Molekulargewicht 6×10^6 auf einen Chloroplasten kommt. Die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab aber, daß auch diese Präparate noch nicht völlig frei von Zellkerntrümmern sind. Daher kann eine plastideneigene DNS als Träger der genetischen Information wahrscheinlich ausgeschlossen werden, zumal die Plastidenmutation sich wie die Genmutation verhalten sollte, wenn DNS der Träger der genetischen Information in den Plastiden wäre.

Demgegenüber läßt sich RNS in den Chloroplasten mit verschiedenen Methoden nachweisen (MENKE 1938, HOLDEN 1952, LITTAU 1958, BRAVERMAN und CHARGAFF 1959). Nach noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen lassen sich verschiedene Ribonucleinsäuren aus den Chloroplasten isolieren. Eine Fraktion wird durch Pankreasribonuclease abgebaut und bei alkalischer Hydrolyse entstehen Mono-Nucleotide, die bei der Elektrophorese die bekannten Beweglichkeiten aufweisen. Außerdem konnte ein nucleotidhaltiger Komplex aus Chloroplasten extrahiert werden, der sich auf der Ultrazentrifuge einheitlich verhält ($S_{20} \sim 1.5$). Dieser wird durch Pankreasribonuclease nicht angegriffen und bei

der Elektrophorese (p_H 3,5; 1,9) verlagern sich die Produkte der alkalischen Hydrolyse nur sehr wenig. Dieser Komplex enthält Aminosäuren und zwar kommt nach den bisherigen Analysen auf 4—5 Mono-Nucleotide etwa eine Aminosäure. Außer Ribose sind noch andere Zucker nachweisbar. Da die Chloroplasten also RNS enthalten, muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß diese der Träger der idiotypischen Komponenten der Plastiden ist. Wenn dies der Fall ist, so müßte die RNS wenigstens zum Teil eine plastideneigene RNS sein; sie müßte also in den Plastiden identisch reproduziert werden und zwar, was ihre Struktur angeht, unabhängig vom Genom. Nach der hier dargelegten Auffassung sollte die RNS der Plastiden jedoch aus dem Zellkern stammen und sie sollte die genetische Information von den Chromosomen auf die Plastiden übertragen, wobei es natürlich offenbleibt, ob nicht eine bestimmte Fraktion der RNS oder ein Ribonucleoproteid Träger von idiotypischen Eigenschaften der Plastiden ist.

Für das hier besprochene Modell der Plastidenmutation ist es nun aber kennzeichnend, daß die Strukturen, welche Träger der idiotypischen Eigenschaften der Plastiden sind, nicht notwendigerweise Träger der genetischen Information sein müssen. Die genetische Information über alle erblichen Plastideneigenschaften kann in den Chromosomen lokalisiert sein. Wohl aber müssen die Plastiden spezifische Strukturen mit Startereigenschaften besitzen. Diese können grundsätzlich Protein, Proteid oder RNS-Moleküle, aber auch übermolekulare Strukturelemente sein. Es gibt jedoch andererseits auch Gründe, die dafür sprechen, daß der Starter selbst Träger der genetischen Information ist. Der Unterschied zwischen den beiden Möglichkeiten besteht darin, daß im ersten Fall das genabhängige Ferment allein bestimmt, welches Reaktionsprodukt gebildet wird, wobei die Synthese aber nur in Anwesenheit des Starters in Gang kommt. Im zweiten Fall bestimmt jedoch der Starter wie bei dem von KORNBERG (1959) untersuchten System der DNS-Synthese, welches Reaktionsprodukt gebildet wird und ob die Synthese überhaupt in Gang kommt. Die Spezifität des Fermentes ist hier eine geringere.

Der im vorstehenden entwickelte Gedankengang ging von der Beobachtung aus, daß die Plastidenmutation irreversibel ist, und daß das Plastom gegen mutagene Agenzien eine andere Empfindlichkeit besitzt als das Genom. Diese Befunde sollten an einem Objekt, das die Untersuchung hinreichend hoher Zahlen von Individuen ohne allzu großen Aufwand zuläßt, gesichert werden. Eine Überprüfung erscheint vor allem deswegen erforderlich, weil MICHAELIS (1958) durch Behandlung von Samen mit radioaktiven Isotopen eine große Zahl von Plastidenmutanten erhielt. Es ist jedoch fraglich, ob diese direkt durch Strahlenwirkung auf die Plastiden induziert werden. Eine eindeutige Prüfung der skizzierten Auffassung wäre möglich, wenn es gelänge, die fraglichen Strukturelemente aus normalen Plastiden herauszupräparieren und in mutierte Plastiden hineinzubringen. Dieser Weg erscheint jedoch beim derzeitigen Stande der Technik nicht sehr erfolgversprechend. Eher dürfte es schon möglich sein, aus Plastiden ein System zu isolieren, welches in vitro Proteine zu synthetisieren vermag, wenn bestimmte Komponenten als Starter anwesend sind. Präparativ chemische Untersuchungen können in diesem Zusammenhang wichtige Vorarbeiten leisten. Im übrigen können durch chemisch-analytische Befunde gewisse Möglichkeiten ausgeschaltet werden, wie etwa die, ob DNS als Träger der genetischen Information

des Plastoms in Betracht zu ziehen ist oder nicht. Auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen an Plastiden in meristematischen Geweben kann eher die genetische Bedeutung eines Strukturelementes ausgeschlossen, als ein Hinweis positiver Art erhalten werden.

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß das genetische Verhalten der Plastiden nur verständlich ist, wenn die Plastiden im Sinne der Meyer-Schimper'schen Theorie morphologische Kontinuität besitzen. In dieser Frage sei auf die Untersuchung von PRINGSHEIM und PRINGSHEIM (1952) hingewiesen. Werden Euglenen bei erhöhter Temperatur kultiviert, so läuft die Zellteilung in schnellerer Folge ab als die Plastidenteilung. Daher entstehen nach Ablauf einer bestimmten Zahl von Zellteilungen plastidenfreie Zellen. Diese bleiben auch unter normalen Kulturbedingungen dauernd plastidenfrei. Es findet keine Neubildung von Plastiden statt, obwohl Zellkern und Plasma aller Wahrscheinlichkeit nach unverändert sind, was sich übrigens durch Transplantation von Plastiden in plastidenfreie Zellen kontrollieren ließe. Hier verhalten sich offenbar die Chloroplasten als ganze so, wie oben für Plastidenstrukturen mit Startereigenschaften angenommen wurde; denn nach Verlust der Chloroplasten entstehen keine neuen, obwohl die Gene, welche die Entwicklung der normalen Plastidenstruktur gewährleisten, im Genom vorhanden sein sollten. Hingewiesen sei noch darauf, daß sich die hier dargelegte Auffassung von der Plastidenmutation auch auf andere extrachromosomale Mutationen, die ein entsprechendes genetisches Verhalten zeigen, übertragen läßt. Hier wäre die von MALY (1958a) untersuchte Teilungsanomalie von *Paramaecium aurelia* zu nennen.

Summary

Hereditary defects of plastids may result from gene mutations or plastid mutations. Gene mutation are reversible by backmutation. Mutation of plastids are irreversible. The rate of gene mutation can be increased by X-ray treatment, but not the rate of plastid mutation. However there are genes, which greatly increase the frequency of plastid mutation. These genes are allelic to such ones controlling the development of the normal structure of plastids.

The different mutational behaviour of plastids may be intelligible, if one supposes that there are structures within the plastids which need for their synthesis in addition to enzyme and substrate small amounts of the reactionproduct as a primer. The formation of the enzyme is genedependent. A mutation of the gene necessary for enzyme formation leads to a reversible blocking of enzyme synthesis and therefore to a lack of reaction product. Through division daughter plastids arise that either do contain or do not contain the primer. In the latter case with irreversible mutation of the plastids, they cannot synthesize the reaction product owing to the loss of the primer even if they are restored through crossing with the nonmutated genome. A spontaneous mutation of a plastid may take place during division, if one of the plastids by chance does not receive the primer. According to this point of view the mechanism of plastid mutation is different from that of gene mutation. Thus it becomes obvious why the susceptibility of plastids to mutagens is quite different from that of genomes.

Für Diskussionen und Hinweise danke ich den Herren Prof. Dr. J. STRAUB und Prof. Dr. FRIEDRICH-FREKSA. Die Arbeit wurde mit Unterstützung der *Deutschen For-*

schungsgemeinschaft ausgeführt. Frl. R. EHRLING danke ich für die Bestimmung von Sedimentationskonstanten.

Literatur

- ARNASON, T. J., and G. W. R. WALKER: An irreversible gene induced plastid mutation. *Canad. J. Res. C* **27**, 172 (1949).
- BRAWERMAN, G., and E. CHARGAFF: Relation of ribonucleic acid to the photosynthetic apparatus in *Euglena gracilis*. *Biochim. biophys. Acta* **31**, 172 (1959).
- CORI, G. T., and C. F. CORI: The activating effect of glycogen on the enzymatic synthesis of glycogen from glucose-1-phosphate. *J. biol. Chem.* **181**, 397 (1939).
- CORRENS, C., u. F. v. WETTSTEIN: Nichtmendelnde Vererbung. In *Handbuch der Vererbungs-wissenschaften*. Berlin 1937.
- HOLDEN, M.: The fractionation and enzymatic breakdown of some phosphorus compounds in leaf tissue. *Biochem. J.* **51**, 433 (1952).
- KORNBERG, A.: Enzymatic synthesis of desoxyribonucleic acid. *Harvey Lect.* **53**, 83 (1939).
- LITTAU, V. C.: A cytochemical study of the chloroplasts in some higher plants. *Amer. J. Bot.* **45**, 45 (1958).
- MALY, R.: Eine genetisch bedingte Störung der Zellteilung bei *Paramaecium aurelia* var. 4. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 397 (1958a).
- MALY, R.: Die Mutabilität der Plastiden von *Antirrhinum majus* L. Sippe 50. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 692 (1958b).
- MENKE, W.: Untersuchungen über das Protoplasma grüner Pflanzenzellen. I. Isolierung von Chloroplasten aus Spinatblättern. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **257**, 43 (1938).
- METZNER, H.: Cytochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Nukleinsäuren in Chloroplasten. *Biol. Zbl.* **71**, 257 (1952).
- MICHAELIS, P.: Genetische, entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen zur Plasmavererbung. II. Über eine Plastidenmutation mit intracellulärer Wechselwirkung der Plastiden, zugleich ein Beitrag zur Methodik der Plasmonanalyse und zur Entwicklungsgeschichte von *Epilobium*. *Planta (Berl.)* **50**, 60 (1957).
- MICHAELIS, P.: Untersuchungen zur Mutation plasmatischer Erbträger, besonders der Plastiden. I. und II. *Planta (Berl.)* **51**, 600, 722 (1958).
- MOTHES, K., J. BÖTTGER u. R. WOILGIEHN: Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Nukleinsäure und Eiweißstoffwechsel in grünen Blättern. *Naturwissenschaften* **45**, 316 (1958).
- PRINGSHEIM, E. G., and O. PRINGSHEIM: Experimental elimination of chromatophores and eye-spot in *Euglena gracilis*. *New Phytologist* **51**, 65 (1952).
- RENNER, O.: Die pflanzlichen Plastiden als selbständige Elemente der genetischen Konstitution. *Ber. Math.-phys. Kl. sächs. Akad. Wiss. Leipzig* **86**, 241 (1934).
- RHOADES, M. M.: Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **29**, 327 (1934).
- SPIEKERMANN, R.: Cytochemische Untersuchungen zum Nachweis von Nukleinsäuren in Proplastiden. *Protoplasma* **48**, 303 (1957).
- STÄUBLI, W.: Zit. nach K. MÜHLETHALER u. A. FREY-WYSSLING, Entwicklung und Struktur der Proplastiden. *J. biophys. biochem. Cytol.* **6**, 507 (1959).
- STEPHENSON, M. L., K. V. THIMANN and P. C. ZAMECNIK: Incorporation of C¹⁴-amino acids in proteins of leaf disks and cell-free fractions of tobacco leaves. *Arch. Biochem.* **65**, 194 (1956).
- STOCKING, C. R., and E. M. GIFFORD jr.: Incorporation of thymidine in chloroplasts of *Spirogyra*. *Res. communications* **1**, 159 (1959).
- STUBBE, W.: Dreifarbenpanaschierung bei *Oenothera*. II. Wechselwirkungen zwischen Geweben mit zwei erblich verschiedenen Plastidensorten. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 189 (1958).
- STUBBE, W.: Genetische Analyse des Zusammenwirkens von Genom und Plastom bei *Oenothera*. *Z. Vererb.-Lehre* **90**, 288 (1959).
- WOODS, M. W., and H. S. DU BUY: Hereditary and pathogenic nature of mutant mitochondria in *Nepeta*. *J. nat. Cancer Inst.* **11**, 1105 (1951).

WILHELM MENKE, Botanisches Institut der Universität Köln,
Köln-Lindenthal, Gyrhofstraße 15—17

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln
ZUR GENETIK VON *PETUNIA HYBRIDA* *

I. DIE SELBSTSTERILITÄT

Von

GISELA MOSIG

(Eingegangen am 12. November 1959)

A. Einleitung

Die Entwicklungsgeschichte und die Vererbung der Selbststerilität bei *Petunia hybrida* folgt nach TERA0 1929, HARLAND und ATTECK 1933, WERGIN 1936, TSENG 1938, MATHER 1944, STOUT 1949 und KOJAN 1950 dem Personatentypus (vgl. BRIEGER 1930). Eine Serie von multiplen Selbststerilitätsallelen (*S*-Genen) bewirkt, daß *S*-Pollenschläuche die Griffel von Pflanzen mit einem gleichen *S*-Gen nicht vollständig durchwachsen können. Die physiologische Grundlage dafür ist eine Immunitätsreaktion, die dann eintritt, wenn ein Pollenantigen und ein Antikörper im Griffel unter dem Einfluß des gleichen *S*-Alleles gebildet werden (LEWIS 1942, 1952, STRAUB 1947, 1948, LINSKENS 1955). Die Tatsache, daß jedes Allel der *S*-Serie sich durch die Bildung eines spezifischen Antigen-Antikörper-Komplexes manifestiert, läßt weitere Untersuchungen wünschenswert erscheinen (LEWIS 1958). Dafür ist es nötig, die *S*-Gene in Kopplungsgruppen zu lokalisieren und die Reaktionen, die unter dem Einfluß bestimmter *S*-Allele ablaufen, sicher von solchen zu unterscheiden, die zwar am Selbststerilitätsmechanismus beteiligt sind, aber durch nichtallele Gene gesteuert werden. Die Versuchsergebnisse der obenerwähnten Autoren stimmen darin überein, daß an der Unterdrückung oder Abschwächung der Selbststerilitätsreaktion bei *Petunia* zur *S*-Serie nichtallele Gene beteiligt sind. Sie widersprechen sich aber darin, ob auch ein zur *S*-Serie gehörendes Allel für die Selbstfertilität verantwortlich ist. Es wurde deshalb von denselben Pflanzen, deren Kopplungsgruppen festgelegt werden sollten, die Vererbung der Selbststerilität bzw. -fertilität untersucht.

B. Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden homozygot selbststerile Pflanzen (S_2S_2 , S_3S_3 , S_7S_7) untereinander und mit selbstfertilen Petunien aus Handelssaatgut gekreuzt. Sie sind in der Tabelle aufgeführt. Die Blütenfarben in der Tabelle sind nach dem Dezimal-Farbtönenkreis und der Dezimal-Buntskala von PAVLOVSKY (nach PACLT 1958) angegeben.

Mehrere F_1 -Pflanzen jeder Kreuzung wurden geselbstet und mit dem selbststerilen Elter rückgekreuzt. Die verschiedenen F_2 - und Rückkreuzungsfamilien wurden getrennt aufgezogen und ausgewertet. Die gefundenen Spaltungszahlen wurden nach der χ^2 -Methode auf Homogenität und auf statistische Übereinstimmung mit den erwarteten geprüft (WEBER 1957). Vor jeder Kreuzung wurden die unreifen Antheren aus den Knospen der Mutterpflanzen entfernt. Die Petalen aller Blüten, die geselbstet werden oder zur Kreuzung dienen sollten, wurden vor dem Aufblühen mit einem Bastfaden zusammengebunden, um die Narben gegen unerwünschte Bestäubungen zu schützen. Die *S*-Gene einer Pflanze ließen sich danach

* Teil einer Dissertation, die bei der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln eingereicht wurde.

bestimmen, ob Testkreuzungen mit homozygot selbststerilen (z. B. S_2S_2 -) Pflanzen Samenansatz ergaben oder nicht. Pollen homozygoter Petunien wird in Griffeln aller Pflanzen gehemmt, die homo- oder heterozygot für das gleiche S -Gen sind. Manchmal ergaben

Tabelle

Sortenname	Arbeitsbezeichnung	Blütenfarbe	Fertilitätsverhältnisse
Mondstein	H 261	flavus	selbstfertil
—	H 176	flavus	selbststeril (S_7S_7)
Feuerkönig	G 89	ruber	selbstfertil
Blütenmeer	G 95	ruber	selbstfertil
—	H 261/1	ruber	selbstfertil
Schneehaube	G 91	purpureus	selbstfertil
Himmelskönigin	G 88	purpureus	selbstfertil
Himmelsröschen	G 86	purpureus	selbstfertil
Himmelsröschen	H 213	purpureus	selbstfertil
Himmelsröschen	H 214	purpureus	selbstfertil
—	G 112	purpureus	pollenletal
Karminpurpur	G 80	purpureus	selbstfertil
König Heinrich	G 84	purpureus	selbstfertil
Schwarzer Prinz	G 98	purpureus	selbstfertil
—	G 97	purpureus	selbstfertil
—	H 217/18	purpureus	selbststeril (S_3S_3)
—	T ₂ U	purpureus	selbststeril (S_3S_3)
—	H 231	purpureus	selbststeril (S_2S_2)
—	H 229	purpureus	selbststeril (S_2S_2)
Balkon-Rathaus	G 96	violaceus	selbstfertil
Blaue Schönheit	G 79	violaceus	selbstfertil
War Admiral	G 103	violaceus	selbstfertil
Blue Bedder	G 100	violaceus	selbstfertil
—	G 175	violaceus	selbstfertil
—	H 247	violaceus	selbststeril (S_6S_6)

inkompatible Kombinationen doch geringen Samenansatz. Die dadurch entstehenden kleinen Kapseln lassen sich aber von den großen Kapseln unterscheiden, die in kompatiblen Kreuzungen gebildet werden. Selbstungen und Rückkreuzungen mit selbststerilen Pflanzen gaben nach Knospenbestäubung Samenansatz (HARLAND und ATTECK 1933).

C. Versuchsergebnisse und Diskussion

Man muß erwarten, daß die Selbststerilität bzw. -fertilität so vererbt wird, wie es in Schema 1 dargestellt ist, wenn ein Selbstfertilitätsgen zur Serie der multiplen S -Allele gehört.

P	$S_fS_f \times S_2S_2$		oder	$S_fS_{10} \times S_2S_2$	
F ₁	S_fS_2			1 $S_fS_2 : 1 S_{10}S_2$	
F ₂		S_f			S_{10}
		S_2			S_2
	S_f	S_fS_f	×	S_{10}	$S_{10}S_{10}$
	S_2	S_2S_f	×	S_2	$S_{10}S_2$

Schema 1

Die F₁-Pflanzen können entweder alle selbstfertil sein oder für selbstfertil: selbststeril im Verhältnis 1:1 spalten. Alle selbststerilen Pflanzen gehören zu

einer Gruppe und sind auch untereinander inkompatibel. Wenn keine S_2 -Pollen-schläuche in S_2S_f -Griffeln durchwachsen, müssen alle Selbstungsnachkommen selbstfertiler F_1 -Pflanzen auch selbstfertil sein. Nur dann, wenn S_2 -Gameten zur Befruchtung kommen, können selbststerile Individuen entstehen, die für S_2 homozygot sein müssen. Die Rückkreuzung einer selbstfertilen F_1 -Pflanze mit dem selbststerilen Elter ($S_2S_f \times S_2S_2$) hat zur Hälfte selbststerile, zur Hälfte selbstfertile Nachkommen. Alle Selbststerilen müssen auch hier homozygot für S_2 sein. Analoge Verhältnisse sind in Kreuzungen mit S_3S_3 - oder S_7S_7 -Pflanzen zu erwarten.

Die Spaltungszahlen aus 12 Kreuzungsnachkommenschaften sprechen dafür, daß die Vererbung der Selbstfertilität diesem Schema folgt. Aus sechs Kreuzungen waren alle F_1 -Pflanzen selbstfertil, während die F_1 von sechs anderen Kreuzungen für selbstfertil:selbststeril spaltete. In den, allerdings nicht vollständig durchgeführten, Testkreuzungen gaben alle geprüften selbststerilen F_1 -Pflanzen aus einer Kreuzung untereinander keinen Samenansatz. Die Selbstungsnachkommenschaften der selbstfertilen F_1 -Pflanzen spalteten in 1192 selbstfertile:92 selbststerile, die Rückkreuzungen in 253 selbstfertile:261 selbststerile Petunien.

Diese Spaltungen aus den verschiedenen Kreuzungen sind in der F_2 mit $p = 0,05-0,10$, in der Rückkreuzung mit $p = 0,70-0,90$ homogen. Selbstungen von Knospen oder von voll aufgeblühten Blüten derselben F_1 -Pflanze ergaben den gleichen Anteil selbststeriler Nachkommen. Alle getesteten selbststerilen Pflanzen (15 aus der F_2 - und 75 aus der Rückkreuzungsgeneration) waren in Übereinstimmung mit der Erwartung homozygot für das betreffende S -Gen. Die selbstfertilen F_2 -Pflanzen aus Kreuzungen mit S_3S_3 -Individuen sollten zur Hälfte S_3S_f , zur Hälfte S_fS_f , d. h. kein S_3 haben. Zwei Kreuzungsnachkommenschaften wurden geprüft, sie spalteten in 87 S_fS_3 :97 S_fS_f .

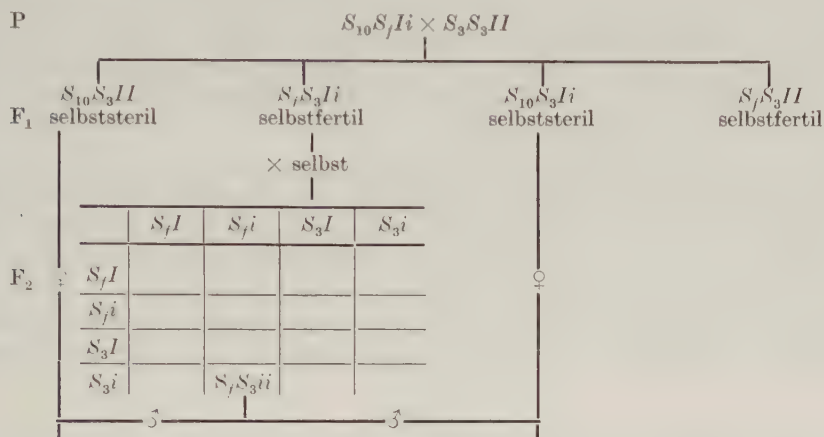
Die geschilderten Ergebnisse stimmen restlos mit den nach Schema 1 zu erwartenden überein. Deshalb kann es als sicher gelten, daß ein Selbstfertilitäts-gen (S_f), das in diesen Kreuzungen für die Vererbung der Selbstfertilität verantwortlich ist, zur Serie der multiplen S -Allele gehört.

Da etwa 7% der F_2 -Pflanzen in allen Nachkommenschaften selbstfertiler F_1 -Individuen selbststeril waren, muß man annehmen, daß (vielleicht unter dem Einfluß des S_f -Gens) etwa 14% der Gameten mit S_2 bzw. S_3 oder S_7 zur Befruchtung gelangten, obwohl der Griffel dasselbe S -Gen enthielt.

Dagegen sprechen die Spaltungen in acht anderen Kreuzungsnachkommenschaften dafür, daß zu den S -Genen nichtallele Faktoren die Selbststerilitätsreaktion beeinflussten. Alle F_1 -Pflanzen aus diesen Kreuzungen waren selbststeril oder nur schwach selbstfertil.

Das Schema 2 zeigt, welche Spaltungszahlen zu erwarten sind, wenn außer dem S_f -Gen ein Allelenpaar $I-i$ an der Vererbung der Selbstfertilität beteiligt ist. Ihm liegt die Annahme zugrunde, daß Pollenkörner von homozygoten ii -Pflanzen die ihrem S -Gen entsprechende Selbststerilitätsreaktion nicht mehr zeigen. S_3 -Pollen, der von ii -Petunien stammt, kann in S_3 -Griffeln durchwachsen. S_3 -Pollen von Ii -Pflanzen wird dagegen gehemmt, gleichgültig, ob ein Pollenkorn I oder i enthält.

Eine Kreuzungsnachkommenschaft wurde genauer untersucht. Zwei selbststerile F_1 -Pflanzen aus der Kreuzung $S_f S_{10} \times S_3 S_3$ wurden mit einer selbstfertilen Pflanze aus einer F_2 -Familie derselben Ausgangskreuzung gekreuzt. (Diese F_2 -Familie stammte von einer selbstfertilen F_1 -Pflanze ab und spaltete in 2 selbststerile:34 selbstfertile Pflanzen; unter den selbstfertilen waren 22 $S_f S_f$ und 12 $S_3 S_f$.)

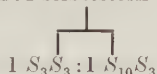


	$S_f i$	$S_3 i$
$S_{10} I$	$S_{10} S_f I i$ selbstfertil	$S_{10} S_3 I i$ selbststeril
$S_3 I$	$S_3 S_f I i$ selbstfertil	$S_3 S_3 I i$ selbststeril

	$S_f i$	$S_3 i$
$S_{10} I$	$S_{10} S_f I i$ selbstfertil	$S_{10} S_3 I i$ selbststeril
$S_3 I$	$S_3 S_f I i$ selbstfertil	$S_3 S_3 I i$ selbststeril
$S_{10} i$	$S_{10} S_f i i$ selbstfertil	$S_{10} S_3 i i$ selbstfertil
$S_3 i$	$S_3 S_f i i$ selbstfertil	$S_3 S_3 i i$ selbstfertil

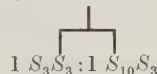
erwartet:

1 selbstfertil : 1 selbststeril



erwartet:

3 selbstfertil : 1 selbststeril



Schema 2

Eine Nachkommenschaft spaltete in

66 selbstfertil : 69 selbststeril

34 $S_3 S_3$: 35 $S_{10} S_3$

die andere in

41 selbstfertil : 18 selbststeril

10 $S_3 S_3$: 8 $S_{10} S_3$.

Die Hälfte der selbststerilen Pflanzen war also homozygot für S_3 . Man muß daraus schließen, daß die S_3 - und S_f -Gameten gleich häufig zur Befruchtung

gelangten. Die Spaltungszahlen stimmen sehr gut mit denen überein, die man nach Schema 2 erwarten muß, wenn eine der zur Kreuzung verwendeten F_1 -Pflanzen homo-, die andere heterozygot für I und die selbstfertile F_2 -Pflanze homozygot für ii war. Sie stützen die Hypothese, daß ein rezessives Gen, wenn es in den Pollenmutterzellen homozygot vorhanden ist, die Selbststerilitätsreaktion der Pollenschläuche verhindert. Man kann sich die Wirkung des Gens I so vorstellen, daß es in den Pollenmutterzellen die Bildung einer Vorstufe des Selbststerilitätsantigens steuert. Unter dem Einfluß eines S -Gens wird in den Pollenschläuchen diese Vorstufe in das spezifische Antigen umgewandelt. In ii -Pflanzen ist die Synthese der Vorstufe blockiert, wodurch sich die S -Gene im Pollen nicht manifestieren können.

Die erwähnte Kreuzungsnachkommenschaft zeigt, daß sich durch die Überlagerung zweier Mechanismen für die Vererbung der Selbstfertilität bzw. -sterilität komplizierte Verhältnisse ergeben können. Wenn man annimmt, daß selbstfertile Elternpflanzen z. B. die Gene $S_{10}S_{11}ii$ haben, läßt sich auch erklären, weshalb aus manchen Kreuzungen selbstfertiler mit selbststerilen Petunien nur selbststerile oder schwach selbstfertile F_1 -Pflanzen hervorgingen und warum deren selbststerile Nachkommen nicht homozygot S_3 (bzw. S_2 oder S_7) sein müssen.

Summary

It is known, that in *Petunia hybrida* self-incompatibility is due to the existence of a series of multiple alleles (S -genes). The inheritance of self-compatibility has been investigated. It can be due to an S_f -allele of the series which causes no incompatibility reaction.

There is, however, another gene, non-allelic to the S -series which causes self-compatibility. If the pollen had originated from anthers which were homozygous recessive for this gene there would be no self-incompatibility-reaction between pollen tubes and styles with the same S -allele.

Literatur

- BRIEGER, F.: Selbststerilität und Kreuzungssterilität im Pflanzenreich und Tierreich. Berlin: Springer 1930.
- HARLAND, S. C., and O. S. ATTECK: The inheritance of self-sterility in *Petunia violacea*. *Genetica* **15**, 89—102 (1933).
- KOJAN, S.: Some further studies of incompatibilities in *Petunia axillaris*. *Bull. Torrey Bot. Club* **77**, 94—102 (1950).
- LEWIS, D.: The physiology of incompatibility. I. The effect of temperature. *Proc. Roy. Soc. B* **131**, 13—25 (1942).
- LEWIS, D.: Serological reactions of pollen incompatibility substances. *Proc. Roy. Soc. B* **140**, 127—135 (1952).
- LEWIS, D., and L. K. CROWE: Unilateral interspecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* **12**, 233—256 (1958).
- LINSKENS, H. F.: Physiologische Untersuchungen der Pollenschlauch-Hemmung selbststeriler Petunien. *Z. Bot.* **43**, 1—44 (1955).
- MATHER, K.: Specific differences in *Petunia*. I. Incompatibility. *J. Genet.* **45**, 215—235 (1944).
- MATSUURA, H.: A bibliographical monograph on plant genetics 1900—1929. 2. Aufl. Sapporo 1933.
- PACLT, J.: Farbenbestimmung in der Biologie. Jena: Gustav Fischer 1958.

- STOUT, A. A.: The genetics of unilateral hybridisation in *Petunia*. *Genetics* **35**, 136 (1950).
- STOUT, A. A.: Intraspecific incompatibilities in diploids of *Petunia*. *Amer. J. Bot.* **36**, 804 (1950).
- STRAUB, J.: Zur Entwicklungsphysiologie der Selbststerilität von *Petunia* II. Das Prinzip des Hemmungsmechanismus. *Z. Naturforsch.* **2b**, 433—444 (1947).
- STRAUB, J.: Neue Ergebnisse der Selbststerilitätsforschung. *Naturwissenschaften* **35**, 23 (1948).
- TERAO, H.: 1923 u. 1929: Zit. nach MATSUURA 1933.
- TSENG, H. P.: Self-sterility in *Antirrhinum* and *Petunia*. *J. Genet.* **36**, 127—138 (1938).
- WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik, 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1957.
- WERGIN, W.: Cytogenetische Untersuchungen an *Petunia hybrida hort.* Genetische Untersuchungen über den Erbgang der Parasterilität und Cytologie der polyploiden Formen. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **71**, 120—155 (1936).

Dr. GISELA MOSIG, Vanderbilt University, Dept. of Biology,
Nashville (Tennessee) USA

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

ZUR GENETIK VON *PETUNIA HYBRIDA* *

II. DIE ANALYSE VON GENEN DER ANTHOXANTHIN- UND ANTHOCYAN-
BILDUNG IN DER BLÜTE

Von

GISELA MOSIG

(Eingegangen am 12. November 1959)

A. Einleitung

Für weitere Untersuchungen über die Struktur und Wirkung der Selbststerilitätsgene von *Petunia* ist es wünschenswert, die Kopplungsgruppen festzulegen und die *S*-Allele zu lokalisieren (vgl. Teil I). Die meisten der bisher für *Petunia* beschriebenen Gene sind aber für Untersuchungen im Zusammenhang mit der Selbststerilität nicht geeignet, da sie die Vitalität oder Fertilität beeinträchtigen und deshalb abweichende Spaltungszahlen zeigen (DALE and STEERE 1934; CORRENS und KAPPERT 1936; v. WETTSTEIN und PIRSCHLE 1938; ZINN 1938; BENL 1949). In dieser Arbeit sollten Blüten- und Pollenfarbgene analysiert und ihre Kopplungsbeziehungen untersucht werden. Die Blüten der Nachkommen aus verschiedenen Kreuzungen zeigten alle Übergänge zwischen roten und blauen Farbtönen und ließen sich auch durch den Vergleich mit Farbtafeln nur ungenau klassifizieren. Die Aufspaltungen ließen sich nicht mit den von MALINOWSKI 1916, RASMUSON 1918, MATHER and EDWARDES 1944 und PARIS and HANEY 1958 für Blütenfarbgene berichteten vergleichen, da Beschreibungen „rot“, „purpur“, „magenta“ u. ä. sehr vom subjektiven Farbempfinden der untersuchenden Personen abhängen. Die genaue Zuordnung aller Pflanzen zu bestimmten Phänotypen war aber eine Voraussetzung für die weitere Analyse. Nach den Angaben von WERCKMEISTER 1952, GEISSMAN and HINREINER 1952, GEISSMAN, JORGENSEN and JOHNSON (1954, 1955), GEISSMAN and HARBORNE 1955, GEISSMAN in PAECH und TRACEY 1955 und SEYFFERT 1955 erschien es sinnvoll, die Blütenfarbstoffe papierchromatographisch zu trennen. Bei Vorversuchen stellte es sich heraus, daß an der Ausbildung der Blütenfarbe einer einzelnen Pflanze stets mehrere Anthocyane oder mehrere Anthoxanthine oder Anthocyane und Anthoxanthine beteiligt sind. Äußerlich identische Farbtypen können Mischungen chemisch verschiedener Pigmente enthalten, und chemisch gleiche Farbstoffe können im Zusammenwirken mit anderen verschiedene Farbtypen vortäuschen. Die Phänotypen wurden deshalb nicht auf Grund ihrer Blütenfarbe, sondern auf Grund ihres qualitativ verschiedenen Pigmentgehaltes klassifiziert, und die Wirkung der Gene wurde durch den Einfluß beschrieben, den sie auf die Bildung bestimmter Farbstoffe hatten.

* Teil einer Dissertation, die bei der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln eingereicht wurde.

B. Material und Methoden

Die Vererbung der Blütenfarbstoffe und der Pollenfarben wurde in denselben Kreuzungsnachkommenschaften untersucht wie die Vererbung der Selbststerilität, die in Teil I beschrieben ist. Die Elternpflanzen sind in der Tabelle in Teil I aufgeführt. Da nicht bekannt war, ob die Parentalpflanzen für alle Gene homozygot waren, wurden gleichzeitig mit der F_1 -Generation Selbstungsnachkommenschaften der Eltern untersucht. (Sie sind im folgenden als S -Generation bezeichnet.) Die Spaltung der Gene für andere Eigenschaften als die Selbststerilität kann durch Kopplung mit den S -Genen beeinflußt werden. In der F_2 einer Kreuzung selbstfertiler mit selbststerilen Pflanzen muß ein rezessives Merkmal bei absoluter Kopplung mit einem S -Gen im Verhältnis von 7:93 statt 25:75, ein dominantes im Verhältnis 57:43 statt 75:25 spalten, da bei der Selbstung selbstfertiler F_1 -Pflanzen nur 14% der S -Gameten zur Befruchtung gelangen (vgl. Teil I).

Das 57:43-Verhältnis entspricht statistisch einer 9:7-Spaltung. Durch die Kopplung eines dominanten Gens mit dem S -Locus wird also in einer monohybriden Kreuzung die Spaltung zweier komplexitär voneinander abhängiger Gene

	A 0,86	a 0,14
A 0,50	AA 0,43	Aa 0,07
a 0,50	Aa 0,43	aa 0,07

	A 0,14	a 0,86
A 0,50	AA 0,07	Aa 0,43
a 0,50	Aa 0,07	aa 0,43

Schema 1

vorgetauscht. Es ist leicht einzusehen, daß bei schwächerer Kopplung mit dem S -Locus auch andere Verhältnisse gefunden werden können. Bei der Rückkreuzung einer selbstfertilen F_1 -Pflanze mit dem homozygot selbststerilen Elter ($S_7S_3 \times S_3S_3$) oder bei der Selbstung einer selbststerilen F_1 -Pflanze ($S_2S_7 \times S_2S_7$) tritt aber keine durch S -Gene beeinflusste Gononkonkurrenz auf. Um durch Kopplung mit dem S -Gen vorgetauschte polygene Spaltungen von wirklichen zu unterscheiden, wurde deshalb die Vererbung fast aller Merkmale auch in den Nachkommenschaften aus den Selbstungen selbststeriler F_1 -Pflanzen und aus Rückkreuzungen selbstfertiler F_1 -Individuen mit den homozygot selbststerilen Eltern untersucht.

Die Spaltungszahlen aller Familien aus einer Kreuzung oder auch aus mehreren Kreuzungen, wenn sie für dasselbe Merkmalspaar spalteten, wurden nur dann zu einer Gesamtspaltung vereinigt, wenn der errechnete p -Wert für Homogenität $> 0,05$ war. Er wurde mit Hilfe des χ^2 -Testes nach $m \times n$ -Tafeln oder nach der Brandt-Snedecor-Formel (nach WEBER 1957) berechnet. Die gefundenen Spaltungszahlen wurden nach der χ^2 -Methode mit den erwarteten verglichen. Die Spaltungszahlen für jeweils zwei Merkmalspaare wurden in 2×2 Tafeln auf Unabhängigkeit geprüft (MATHER 1951). War der p -Wert für unabhängige Spaltung $< 0,01$, wurde der Rekombinationswert nach der Produktformel und den Tabellen von IMMER (1930) bestimmt.

Die Farbstoffe ließen sich aus den frischen Blüten in der Reibschale mit 0,1 n-HCl extrahieren und nach der Streifenmethode (MATTHIAS 1954) papierchromatographisch trennen. Als Lösungsmittel diente die organische Phase des Gemisches Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5), als Papier die Sorte „2045 b gewaschen“ der Fa. Schleicher und Schüll. Auf den entwickelten Chromatogrammen wurden die Anthocyane nach ihrer Färbung im Tageslicht bestimmt. Manche Blüten enthielten hellgelbe Pigmente, die sich in Ammoniakatmosphäre intensiv gelb färbten, im UV-Licht dunkelbraun oder orange erschienen und ihre Fluoreszenzfarbe unter Ammoniakeinfluß änderten. Sie sollen im folgenden als Anthoxanthine bezeichnet werden.

Für die Auswertung der Versuche erhielten die Substanzen, die sich durch ihre Wanderungsgeschwindigkeiten und durch ihre Absorption im Tages- und UV-Licht unterscheiden ließen, Arbeitsbezeichnungen. Die für die Genanalyse wichtigen Anthoxanthine wurden Fl_1 - Fl_5 , die Anthocyane An_1 - An_{10} benannt. Beim Vergleich der Chromatogramme zeigte es sich, daß einige Pigmente, wenn sie überhaupt gebildet wurden, immer mit bestimmten Farbstoffen zusammen auftraten, während sie das gleichzeitige Vorkommen anderer ausschlossen. Zum Beispiel wurde Fl_4 nur in solchen Blüten gefunden, die auch Fl_3 enthielten, aber nie zusammen mit Fl_2 . Auf Grund dieser Beobachtung ließen sich die Farbstoffe in Gruppen zusammenfassen. In Tabelle 1 sind die untersuchten Pigmentgruppen, die zu ihnen gehörenden Einzelfarbstoffe und die Kreuzungseltern, in denen sie ursprünglich gefunden

wurden, aufgeführt. Zu jeder Gruppe gehören noch andere als die hier benannten Einzel-farbstoffe. Ihre Vererbung wurde aber nicht einzeln untersucht.

Der Phänotyp jeder Einzelpflanze der Parental-, F_1 -, F_2 -, F_3 - und Rückkreuzungsgeneration wurde nach den gebildeten Pigmentgruppen und Einzelfarbstoffen bestimmt.

Alle untersuchten Petunienblüten enthielten geringe Mengen zweier Substanzen, die im UV-Licht absorbierten. Dadurch wurden aber die Blütenblätter der anthocyanfreien Pflanzen nicht hellgelb gefärbt und der Farbton der anthocyanhaltigen Petalen nicht verändert. Außerdem enthielten alle Blüten hell fluoreszierende Substanzen, deren Spaltungen nicht

analysiert wurden. Von diesen Stoffen wird in den folgenden Beschreibungen anthoxanthinhaltiger und -freier Blüten abgesehen.

Die Beurteilung der weißblühenden Pflanzen schien anfangs deshalb nicht sicher, weil reinweiße Blüten durch Scheckung vorgetäuscht werden können. Die Petalen von Pflanzen, die Gene für Anthocyan- und Anthoxanthinbildung tragen, können nämlich so stark weiß gescheckt sein, daß sie keine pigmentierten Sektoren mehr ausbilden. Die genetische Grundlage der Blütenscheckung bei *Petunia* ist trotz umfangreicher Versuche von HARDER 1934, v. WITSCH 1939, FERGUSON 1939 und LEVAN 1939 noch nicht widerspruchsfrei geklärt. Dagegen ist es nach den Arbeiten von SCHRÖDER 1934, HARDER 1934 und HARDER und MARHEINEKE 1936 sicher, daß an solchen Pflanzen, die genetisch die Fähigkeit zur Sektorenbildung haben, der Scheckungsgrad durch Lichtintensität und Temperatur zu beeinflussen ist. Die Kreuzungsnachkommen, von denen es nicht sicher war, ob sie auf Grund ihrer genetischen Konstitution weder Anthocyane noch Anthoxanthine bilden konnten, oder ob sie durch extreme Scheckung reinweiße Blüten hatten, wurden in Klimakammern darauf geprüft, ob sie unter geeigneten Bedingungen gefärbte Petalen auszubilden vermögen.

C. Ergebnisse der Untersuchungen

Die Spaltungszahlen in den Nachkommen-schaften aller Kreuzungen anthocyanhaltiger mit anthocyanfreien Petunien beweisen, daß unter dem Einfluß eines dominanten Gens (A) die Anthocyanbildung ermöglicht, durch dessen

rezessives Allel dagegen blockiert wird. Alle F_1 -Pflanzen aus neun verschiedenen Kreuzungen bildeten Anthocyane. Die F_2 -Nachkommenschaften spalteten in

1437 anthocyanhaltige:505 anthocyanfreien Pflanzen
(3:1 = 1456,5:485,5; $\chi^2 = 1,044$; $p = 0,30-0,50$),

sechs Rückkreuzungsnachkommenschaften heterozygoter F_1 - mit aa -Pflanzen erwartungsgemäß in

226 anthocyanhaltige:201 anthocyanfreie Petunien

1:1 = 213,5:213,5 $\chi^2 = 1,462$; $p = 0,20-0,30$).

Die Adern der Petalen von aa -Pflanzen waren manchmal schwach rosa gefärbt. Die dafür verantwortlichen Anthocyane waren in allen untersuchten Blüten gleich und wurden nicht durch die Anthoxyangene beeinflusst, die im folgenden beschrieben werden sollen. Da auch STÖRMER und v. WITSCH (1938) schon berichteten, daß das Anthocyan der Blütenblattadern

Tabelle 1

Einzel-farb-stoff	Pig-ment-gruppe	gefunden in
Fl_1 Fl_2	Fl_α	Schneehaube War Admiral
Fl_3 Fl_4	Fl_β	H 176 Mondstein Blue Bedder Balkon Rathaus Blaue Schönheit
Fl_5	Fl_γ	H 176 Mondstein Schneehaube
An_1 An_2 An_3 An_4	An_α	Feuerkönig Blütenmeer H 261/1
An_5 An_6 An_7	An_β	T_2U H 217/18 H 231 König Heinrich Balkon Rathaus Blaue Schönheit War Admiral Blue Bedder
An_8 An_9 An_{10}	An_γ	Balkon Rathaus Blaue Schönheit War Admiral Blue Bedder G 175

auf einem anderen Syntheseweg gebildet wird als das der übrigen Teile der Petalen, wurde die gelegentliche Färbung der Adern in den Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Die Blüten der anthocyanfreien Kreuzungseltern waren creme gefärbt. Sie enthielten wie auch die der Sorte Schneehaube und aller blaublühenden Petunien Anthoxanthine. Die rotblühenden Elternpflanzen waren dagegen anthoxanthinfrei. Auch die untersuchten anthoxanthinhaltigen und -freien Pflanzen unterschieden sich nur durch ein Gen (*B-b*). Alle F_1 -Pflanzen aus Kreuzungen anthoxanthinhaltiger mit anthoxanthinfreien Petunien bildeten die gelben Pigmente. Zehn F_2 -Nachkommenschaften spalteten in

1695 anthoxanthinhaltige:535 anthoxanthinfreie

(3:1 = 1672,5:557,5; $\chi^2 = 1,211$; $p = 0,20-0,30$),

acht Rückkreuzungsnachkommenschaften in

344 anthoxanthinhaltige:320 anthoxanthinfreie Pflanzen

(1:1 = 332:332, $\chi^2 = 0,867$; $p = 0,30-0,50$).

Es war zu prüfen, ob die Gene für Anthocyan- und Anthoxanthinbildung unabhängig voneinander wirken können, oder ob Anthocyane nur in Pflanzen mit dem Gen *B* gebildet werden. Wenn beide Faktoren ungekoppelt sind und *A* sich nur in Gegenwart von *B* manifestieren kann, muß man in der F_2 einer dihybriden Kreuzung ein 9:7-Verhältnis von anthocyanhaltigen:anthocyanfreien Pflanzen erwarten. Eine Testkreuzung heterozygoter mit doppelt rezessiven Pflanzen (*AaBb* \times *aabb*) sollte 1:3 spalten. Wenn beide Gene unabhängig voneinander wirken, muß man dagegen in der F_2 ein 9:3:3:1-, in der Testkreuzung ein 1:1:1:1-Verhältnis von anthocyan- und anthoxanthinhaltigen:anthocyanhaltigen, anthoxanthinfreien:anthocyanfreien, anthoxanthinhaltigen:anthocyan- und anthoxanthinfreien Pflanzen finden. Alle F_1 -Pflanzen aus verschiedenen Kreuzungen anthocyanhaltig, anthoxanthinfrei \times anthocyanfrei, anthoxanthinhaltig bildeten in ihren Blüten sowohl Anthocyane als auch Anthoxanthine. Die gelben Farbstoffe wirkten dann als Co-Pigmente. Dadurch erschien die Farbe der Petalen heller und blaustichiger als die anthoxanthinfreien Blüten mit denselben Anthocyanen. (Auf die Verhältnisse in den blauen Blüten soll weiter unten eingegangen werden.) Drei Nachkommenschaften spalteten in der F_2 in 441 anthocyan- und anthoxanthinhaltige:148 anthocyanhaltige, anthoxanthinfreie:172 anthocyanfreie, anthoxanthinhaltige:42 anthocyan- und anthoxanthinfreie Pflanzen.

(9:3:3:1 = 451,7:150,5:150,6:50,2; $\chi^2 = 4,723$; $p = 0,10-0,20$)

Heterozygote F_1 -Pflanzen, die Anthocyane und Anthoxanthine bildeten, wurden mit einer anthocyan- und anthoxanthinfreien F_2 -Pflanze gekreuzt. Diese Testkreuzung spaltete in

66:54:45:61

für Pflanzen mit den oben aufgeführten Merkmalskombinationen (1:1:1:1 = 56,5:56,5:56,5:56,5; $\chi^2 = 4,4070$; $p = 0,20-0,30$).

Auch die Einzelspaltungen für Anthocyan- ($\chi^2 = 0,867$; $p = 0,30-0,50$) und Anthoxanthinvererbung ($\chi^2 = 0,035$; $p = 0,50-0,70$) sind statistisch gut gesichert. Zwischen beiden

Genen besteht keine Kopplung; das χ^2 für unabhängige Spaltung entspricht mit 3,545 einem p-Wert von 0,05—0,10.

Sowohl die Spaltungszahlen der F_2 als auch die der Rück- und Testkreuzungen beweisen, daß nur Petunien mit den Genen *A* oder *B* bzw. *A* und *B* Blütenfarbstoffe ausbilden. Die beiden Faktoren für die Anthocyan- und Anthoxanthinbildung sind nicht gekoppelt und wirken unabhängig voneinander.

Nach der Auswertung aller Kreuzungsnachkommenschaften zeigte es sich, daß von ihnen abhängige Gene, die als *Anthocyan-* und *Anthoxanthingene* bezeichnet werden sollen, sich durch die Bildung bestimmter *Farbstoffgruppen* bzw. durch die Synthese von *Einzelpigmenten* manifestierten. Zur Vereinfachung der Darstellung soll zunächst an einem Beispiel geschildert werden, wie sich die Wirkung und Vererbung der Gene aus den Spaltungen analysieren läßt, wenn die Bildung von Anthocyan, zweier Anthocyangruppen und zweier Einzelfarbstoffe von drei Genpaaren gesteuert wird, die voneinander abhängig wirken.

Das Gen *X* sei für die Bildung von Anthocyan verantwortlich; *xx*-Pflanzen synthetisieren kein Anthocyan. In *X*-Pflanzen entstehen unter dem Einfluß des Gens *Y* Farbstoffe der Gruppe An_e (z. B. An_{21} , An_{25} und An_{26}), in *yy*-Pflanzen statt dessen Pigmente der Gruppe An_δ (z. B. An_{21} , An_{22} und An_{23}). Der Farbstoff An_{24} wird in den *Y*-Pflanzen nur ausgebildet, wenn sie auch das Gen *Z* besitzen; *zz*-Pflanzen synthetisieren nur An_{25} und An_{26} . Das Allelenpaar *Z-z* kann verschieden von *Y-y* abhängen. Entweder es kann sich in *yy*-Pflanzen überhaupt nicht manifestieren, weil der Farbstoff An_{24} nur zusammen mit den anderen Pigmenten der Gruppe An_e gebildet werden kann, oder es beeinflusst in *yy*-Pflanzen die Bildung eines Einzelfarbstoffes der Gruppe An_δ , z. B. An_{21} . Wenn alle drei Gene ungekoppelt sind, sollte die Selbstungsnachkommenschaft einer heterozygoten Pflanze 9:3:4 für $An_e:An_\delta$:anthocyanfrei spalten. Prüft man nur die anthocyanhaltigen Pflanzen, muß man ein 3:1-Verhältnis für $An_e:An_\delta$ erwarten. $\frac{3}{4}$ der An_e -Pflanzen bilden An_{24} , $\frac{1}{4}$ nicht. Wenn sich die *Z-z*-Spaltung in *yy*-Pflanzen bemerkbar macht, d. h. wenn die Synthese des Farbstoffes An_{21} von demselben Gen gesteuert wird wie die von An_{24} , haben auch $\frac{3}{4}$ der An_δ -Pflanzen An_{21} , $\frac{1}{4}$ nicht. Dieses 9:3:3:1-Verhältnis ist auch dann zu erwarten, wenn die Bildung des An_{21} von einem anderen Gen abhängt als die von An_{24} und wenn die betreffende Elternpflanze auch für dieses Gen heterozygot war. Dann müssen einige Nachkommenschaften heterozygoter *Yy*-Individuen, die kein An_{24} bilden, für An_e ohne An_{21} : An_δ mit An_{21} : An_δ ohne An_{21} spalten. Andernfalls bilden alle Nachkommen entweder die Farbstoffgruppe An_e ohne An_{24} oder An_δ ohne An_{21} . Die wirklich gefundenen Spaltungen können dadurch komplizierter werden, daß ein Schritt, z. B. die Umwandlung von An_δ in An_e nicht durch ein, sondern durch mehrere komplementäre Gene gesteuert wird, oder daß nicht statt einer Farbstoffgruppe eine andere, sondern eine zusätzliche gebildet wird. Wenn außerdem einige in ihrer Wirkung voneinander abhängige Gene gekoppelt sind, lassen sich die Spaltungen in den F_2 - und F_3 -Generationen nicht analysieren.

Die Auswertung der Kreuzungsnachkommenschaften zeigte, daß die Anthocyan- und Anthoxanthinfaktoren so wirken und vererbt werden, wie es in diesem Beispiel geschildert wurde. In Tabelle 2 sind die Spaltungszahlen für Pflanzen mit verschiedenen Pigmentgruppen zusammengefaßt. Zum Teil wurden sie in den Kreuzungsnachkommenschaften von Pflanzen gefunden, die sich in den betreffenden Farbstoffgruppen unterschieden, zum Teil aber auch in solchen Nachkommenschaften, deren Parentalpflanzen zwar verschiedene Farbstoffgene besaßen, die Pigmente aber nicht bilden konnten.

Die F_1 -Pflanzen zweier Kreuzungen

$$Fl_\alpha \times \text{anthoxanthinfrei}$$

enthielten die Pigmente der Gruppe Fl_β , ihre Selbstungsnachkommen entweder die der Gruppe Fl_α oder Fl_β . Diese Spaltung beweist, daß die anthoxanthinfreien

Elternpflanzen das Gen *C* besaßen. Es konnte sich aber nur in solchen Petunien manifestieren, die unter dem Einfluß des Faktors *B* zur Anthoxanthinsynthese fähig waren. Analoge Verhältnisse wurden auch für die Anthocyangene gefunden. F_1 -Pflanzen aus den Kreuzungen

$$An_\alpha \times \text{anthocyanfrei}$$

oder

$$An_\beta \times An_\alpha$$

bildeten außer Anthocyanen der Gruppe An_β solche der Gruppe An_γ . Die 9:7-Spaltung in der F_2 (bezogen auf die Zahl der Pflanzen, die An_β enthielten) zeigt, daß die Gruppe An_γ zusätzlich zu An_β unter dem Einfluß zweier komplementärer Gene (*G* und *H*) gebildet wird. Einer dieser Faktoren mußte aus dem anthocyanfreien Kreuzungselter bzw. aus dem mit der Pigmentgruppe An_α stammen. Die Manifestation beider Gene war aber außerdem noch davon abhängig, daß das Gen *A* die Anthocyan-synthese und *F* die Bildung der Gruppe An_β ermöglichte. In der F_2 -Generation der Kreuzungen

$$(An_\beta + An_\gamma) \times An_\beta \quad (GGHH \times GGhh)$$

waren die gefundenen 3:1-Spaltungen zu erwarten, weil die Pflanzen, die nur die Gruppe An_β bildeten, einen der Komplementärfaktoren enthielten.

Tabelle 2

Pigmentgruppen	Generation	Ge-fundene Spaltung	An-gen. Ver-hält-nis	Erwartete Spaltung	χ^2	p	Gen	Voraus-setzung
$Fl_\beta:Fl_\alpha$	F_2	729:242	3:1	728,25:242,75	0,003	0,95—0,98	<i>C-c</i>	<i>B</i>
$An_\beta:An_\alpha$	F_2	634:229	3:1	647,25:215,75	1,085	0,20—0,30	<i>F-f</i>	<i>A</i>
	F_3	41:9	3:1	37,5:12,5	1,33	0,20—0,30		
	F_2	163:88	3:1	188,25:62,75	13,49	< 0,01		
$(An_\beta + An_\gamma):An_\beta$	F_2	66:47	9:7	63,6:49,4	0,207	0,50—0,70	$G-g$ + <i>H-h</i>	<i>A+F</i>
	R	17:17	1:1	17:17				
	F_2	412:306	9:7	403,9:314,1	0,371	0,50—0,70		
	R	82:75	1:1	78,5:78,5	0,312	0,50—0,70		
	F_2	393:108	3:1	375,75:125,25	1,168	0,05—0,10	<i>H-h</i>	<i>A+F+G</i>
	R	82:85	1:1	83,5:83,5	0,053	0,80—0,90		

Zwei Familien zeigten statistisch gesicherte Abweichungen von der 3:1-Spaltung für Pflanzen mit den Farbstoffgruppen An_β und An_α . Bei der Besprechung der Kopplung soll darauf noch eingegangen werden.

Spaltungen für die Faktoren, die Anthocyangruppen beeinflussten, konnten nur dann nachgewiesen werden, wenn unter dem Einfluß des Gens *A* die Anthocyan-synthese überhaupt möglich war. Analoges gilt für die Anthoxanthingruppen-gene. Auch die Faktoren für die Bildung der Einzelpigmente manifestierten sich nicht in allen Parentalpflanzen oder anders als in ihren Kreuzungsnachkommen-schaften, weil sie in ihrer Wirkung von den Genen *A* oder *B* und außerdem von den Faktoren für die Farbstoffgruppen abhingen. Die Spaltungszahlen für das Vorhandensein oder Fehlen verschiedener Einzelpigmente sind in Tabelle 3 aufgeführt. Sie sind bezogen auf die Zahl der Pflanzen, welche die entsprechende Pigmentgruppe bildeten.

Tabelle 3

Pigment	Generation	Gefundene Spaltung	Angen. Verhältnis	Erwartete Spaltung	χ^2	p	Gen	Voraussetzung
Fl ₄	S F ₁	68:24 26:21	3:1 1:1	69:23 23,5:23,5	0,057 0,532	0,80—0,90 0,30—0,50	D—d	B + C
Fl ₅	S F ₁	66:26 26:21	3:1 1:1	69:23 23,5:23,5	0,521 0,532	0,40—0,50 0,30—0,50	E—e	B
An ₇	S F ₂ F ₂ F ₂	23:96 54:153 38:80 67:148	1:3 1:3 1:3 1:3	29,75:89,25 51,75:155,25 29,5:88,5 53,75:161,25	2,042 0,131 3,265 4,354	0,10—0,20 0,70—0,80 0,05—0,10 0,02—0,05	k—K k—K bzw. m—M	A + F
An ₆	F ₂ R F ₃	103:39 68:21 41:9	3:1 3:1 3:1	106,5:35,5 66,75:22,25 37,5:12,5	0,460 0,09 1,33	0,40—0,50 0,50—0,80 0,20—0,50	L—l	A + F
An ₁	F ₂	37:40	1:3 7:9	19,25:57,75 33,7:43,3	21,84 0,576	< 0,01 0,30—0,50	k—K bzw. m—M	A + ff
An ₂	F ₂	62:17	3:1	59,25:19,75	0,510	0,40—0,50	L—l	A + ff

Die Spaltungszahlen in den Nachkommenschaften der Kreuzungen

An _{α} mit An₁, ohne An₂ \times An _{β} mit An₆, ohne An₇

sprechen dafür, daß unter dem Einfluß des gleichen Gens *L* in *F*-Pflanzen An₆, in *ff*-Pflanzen An₂ gebildet wird, und daß die Gene *K* bzw. *M* in *F*-Petunien die Synthese von An₇, in *ff*-Indivuen die von An₁ blockieren. In allen geprüften F₃-Nachkommenschaften, die von *Ff*-Pflanzen ohne An₆ abstammten, wurden entsprechend dem oben geschilderten Beispiel nur An _{α} -Pflanzen ohne An₂ gefunden, und alle An _{α} -Pflanzen, die von An _{β} -Individuen mit An₇ abstammten, bildeten An₁. (In keiner An _{β} -Pflanze fehlte An₆ und An₇, in keiner An _{α} -Pflanze An₁ und An₂.) Auch die weiter unten beschriebenen Austauschwerte zu einem Gen für anthocyanhaltigen Pollen stützen die Annahme, daß An₇ und An₁ unter dem Einfluß der gleichen Gene gebildet werden.

Alle blauen Petunienblüten enthielten Anthocyane und Anthoxanthine. Die F₁-Pflanzen aus Kreuzungen blaublühender mit rotblühenden (anthocyanhaltigen, anthoxanthinfreien) Petunien hatten blaue Petalen. Wie schon beschrieben, werden die Faktoren für Anthocyan- und Anthoxanthinbildung unabhängig voneinander vererbt. In der F₂ wurden Pflanzen mit den Anthocyanen der blaublühenden Eltern (An _{β} + An _{α}), aber ohne Anthoxanthine gefunden. Sie blühten rot. Dagegen hatten nicht alle anthocyan- und anthoxanthinbildenden F₂-Pflanzen blaue, sondern z. T. verwaschen lilagefärbte Blüten, wie sie in den Nachkommenschaften der Kreuzungen anthocyanhaltiger, anthoxanthinfreier mit anthocyanfreien, anthoxanthinhaltigen Petunien vorkommen. Die Chromatogramme von blau oder verwaschen lila gefärbten Blüten ließen sich nicht unterscheiden. Es müssen außer den Genen *A* und *B* für Anthocyan- und Anthoxanthinsynthese noch andere Faktoren dafür sorgen, daß durch das Zusammenwirken dieser beiden Stoffgruppen die Blüten nicht nur co-pigmentiert, sondern intensiv blau erscheinen. Eine Erklärung für diese Befunde ist die, daß in den blauen Blüten die Anthocyane und Anthoxanthine zu einem Komplex vereinigt

sind, der bei den in dieser Untersuchung angewendeten Methoden durch die Säureextraktion gespalten wird. Dieser Komplex wird unter dem Einfluß von Faktoren gebildet, die sich nur abhängig von den Genen *A* und *B*, vielleicht auch von bestimmten Anthocyan- und Anthoxanthingenen manifestieren können.

Von den Pflanzen der Aussaat-Nr. H 231 hatten einige nicht einheitlich gefärbte, sondern mehr oder weniger gesprenkelte Blüten. Dieses Merkmal ist wahrscheinlich identisch mit der mosaikartigen Pigmentverteilung, die von MALINOWSKI 1936 und MALINOWSKI and BANKOWSKA 1956 beschrieben worden ist. Nach MALINOWSKI wird dieses Muster durch eine Reihe von labilen Allelen vererbt, die in Richtung von rezessiv zu dominant mutieren können. Einheitliche Färbung ist immer dominant. Die Ergebnisse aus den Kreuzungsversuchen mit gesprenkelten Pflanzen stimmen mit den von MALINOWSKI geschilderten überein. Deshalb soll hier nicht auf die Vererbung dieser labilen Allele eingegangen werden. Es sei aber erwähnt, daß die gesprenkelten Blüten, unabhängig von ihrer genetischen Konstitution in bezug auf die Farbstoffgene, einen orange fluoreszierenden Stoff enthielten, dessen Konzentration vom Grad der Sprenkelung abhing.

Die Vererbung und Ausbildung der Pollenfarben war unabhängig von der der Blütenfarben. Blauer und grüner Pollen enthielt Anthocyan, gelber und weißer nicht. Die Pollenpigmente wurden nicht papierchromatographisch getrennt. In den verschiedenen Kreuzungsnachkommenschaften ließen sich Faktoren für den Unterschied zwischen anthocyanhaltigem und anthocyanfreiem und zwischen gelbem und weißem Pollen analysieren. Durch das Zusammenwirken der Gene für anthocyanhaltigen und für gelben Pollen entstand grüne, in der Kombination „anthocyanhaltig“ und „weiß“ blaue Pollenfarbe. In Tabelle 4 sind die Spaltungen für die Pollenfarben in der F_2 zusammengefaßt.

Tabelle 4

Pollen Spaltung für	Zahl der Kreuzungen	Gefundene Spaltung	Angen. Verhältnis	Erwartete Spaltung	χ^2	p	Gen
Anthocyanhaltig/-frei	3	582:181	3:1	572,25:190,75	0,664	0,30—0,50	<i>U—u</i> oder <i>T—t</i>
	10	873:661	9:7	862,9:671,1	0,270	0,50—0,70	<i>U—u</i> und <i>T—t</i>
	3	459:239	9:7	392,6:305,4	25,7	< 0,01	
Weiß/Gelb	11	1457:515	3:1	1479:493	1,309	0,20—0,30	<i>W—w</i> oder <i>V—v</i>
	2	107:76	9:7	103,1:79,9	0,33	0,20—0,30	<i>W—w</i> und <i>V—v</i>

Die F_1 -Pflanzen aus 10 Kreuzungen zwischen Eltern mit anthocyanfreiem bildeten anthocyanhaltigen Pollen. Die 9:7-Spaltung in der F_2 für Pflanzen mit anthocyanhaltigem :freiem Pollen beweist, daß die Anthocyanbildung in den Antheren durch mindestens zwei komplementäre Gene gesteuert wird. Auf die drei Familien mit den abweichenden Spaltungszahlen soll bei der Besprechung der Kopplung noch eingegangen werden.

Weiße Pollenfarbe ist dominant über gelbe. Auch dieser Unterschied ist durch mindestens zwei komplementäre Gene bedingt, von denen in den meisten Familien nur eines spaltete.

Eine Anzahl der hier beschriebenen Gene sind miteinander gekoppelt. Es sind im folgenden, mit einer Ausnahme, nur die Merkmalskombinationen aufgeführt, deren p-Werte für unabhängige Spaltung $< 0,01$ waren. Die angegebenen Rekombinationswerte sind naturgemäß mit einem Fehler behaftet, weil sie nicht aus Rückkreuzungs-, sondern aus F_2 -Daten ermittelt wurden. Diesen Berechnungen liegt die unbewiesene Annahme zugrunde, daß der Austausch bei der Bildung der männlichen und weiblichen Keimzellen gleich häufig ist. Es ergaben sich dadurch Komplikationen, daß auch Gene, deren Manifestation voneinander abhing, gekoppelt waren. Dann konnten die Genkombinationen nicht aus allen Phänotypen erschlossen werden. Die Austauschwerte haben deshalb außer dem statistischen einen methodischen Fehler und konnten manchmal auch nicht näherungsweise bestimmt werden.

Zunächst sei die Kopplung zwischen und mit den Pollenfarbgene besprochen. In den drei Kreuzungsnachkommenschaften, die abweichend vom 9:7-Verhältnis für Pflanzen mit anthocyanhaltigem : -freiem Pollen spalteten, war einer der Komplementärfaktoren für anthocyanhaltigen mit einem Gen für gelben Pollen

Tabelle 5

Pollen	antho- cyanhaltig		antho- cyanfrei		RW %	Fehler %
	weiß	gelb	weiß	gelb		
Pollenfarbe . .	blau	grün	weiß	gelb		
H 231 \times G 91	133	39	42	40	26,5	3,1
H 176 \times G 88	83	18	27	21	25,0	4,0
H 176 \times G 86	41	13	30	10	—	—
H 231 \times G 89/2	138	59	93	15	16,0	12,7

gekoppelt, in zwei Kreuzungen in der Kopplungs-, in einer in der Repulsionsphase. Die Bestimmung des Austauschwertes ist im zuletzt genannten Fall sehr ungenau. In Tabelle 5 sind die F_2 -Spaltungszahlen und die Rekombinationswerte der

erwähnten Kreuzungen zusammengefaßt und mit den Daten aus einer anderen Kreuzung verglichen, in der die spaltenden Pollenfarbgene nicht gekoppelt waren.

Es kann nicht sicher entschieden werden, worauf die Abweichung von der erwarteten 9:7-Spaltung für Pflanzen mit anthocyanhaltigem : -freiem Pollen in diesen Nachkommenschaften zurückzuführen ist. Sie könnte erklärt werden, wenn ein rezessives Allel mit S_2 (bzw. S_7) gekoppelt wäre und zwischen beiden Genen etwa 30% Austausch angenommen würde. In den Kreuzungen H 176 \times G 86 und H 176 \times G 88 ist aber der homozygot selbststerile Elter derselbe. Trotzdem wurde in einer Kreuzung eine 9:7-, in der anderen eine 2:1-Spaltung beobachtet. Außerdem spalteten die Faktoren für gelben und für anthocyanhaltigen Pollen in einer Nachkommenschaft frei, während sie in der anderen gekoppelt waren. Das läßt vermuten, daß in den beiden Kreuzungen die an der Spaltung beteiligten Gene für anthocyanhaltigen Pollen nicht identisch sind, und daß in der Nachkommenschaft z. B. der Kreuzung H 176 \times G 88 ein drittes Komplementärgen segregierte. Die Abweichung von dem dann erwarteten 27:37-Verhältnis könnte durch Kopplung zwischen zwei der drei beteiligten Gene erklärt werden. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, daß in der Kreuzung H 231 \times G 89/2 (in der eine 2:1-Spaltung für anthocyanhaltigen:anthocyanfreiem Pollen gefunden wurde) die Anthocyangruppe An_β zwar gekoppelt mit anthocyanhaltigem Pollen vererbt wurde, daß aber der Austauschwert erheblich von dem in anderen Kreuzungen

zungen bestimmten abweicht. Die Tabelle 6 enthält die F_2 -Spaltungszahlen und daraus errechneten Rekombinationswerte zwischen Faktoren für anthocyanhaltigen Pollen und Genen für die Umwandlung der Anthocyangruppe An_α und An_β aus vier verschiedenen Kreuzungen.

Auch die Austauschwerte aus den drei anderen Kreuzungsnachkommenschaften (in denen anthocyanhaltiger: -freiem Pollen 9:7 spaltete) stimmen nicht überein. Man kann annehmen, daß an den

jeweils monohybriden Spaltungen für Pflanzen mit der Farbstoffgruppe An_α bzw. An_β zwei verschiedene Allelenpaare (F_a und F_b) beteiligt sind, die aber in derselben Kopplungsgruppe liegen. Diese Hypothese würde auch erklären, daß

in zwei Kreuzungsnachkommenschaften Pflanzen mit der Pigmentgruppe An_β oder An_α nicht im Verhältnis 3:1 oder 9:7, sondern im Verhältnis 2:1 auftraten (vgl. Tabelle 2). Es spalteten dann beide gekoppelten Gene.

In einer Nachkommenschaft, die u. a. für anthocyanhaltigen: -freiem Pollen, für die Pigmente der Gruppe An_β und An_α und für die Einzelfarbstoffe An_7 und An_1 spaltete, wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Rekombinationswerte gefunden.

Tabelle 7

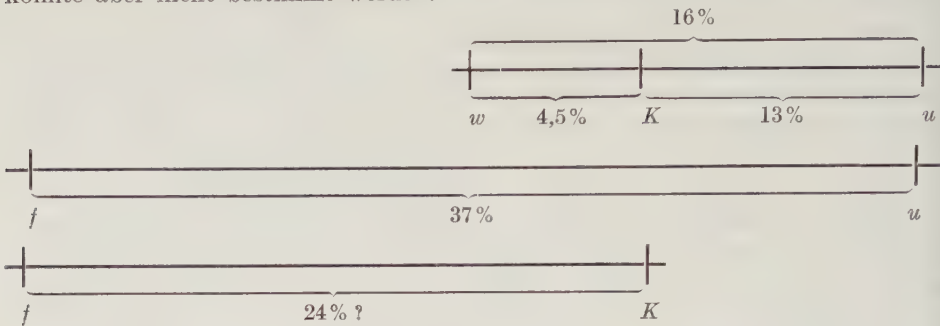
	Pollen				RW	Fehler
	anthocyanhaltig		anthocyanfrei			
	Farbstoff					
	ohne An ₇	mit An ₇	ohne An ₇	mit An ₇		
					%	%
H 231 × G 89/2	102	18	25	42	13,5	2,6
	ohne An ₁	mit An ₁	ohne An ₁	mit An ₁		
	26	10	8	24	11,5	4,0

Die Austauschwerte zwischen den Pollenfaktoren und den für die Synthese von An_7 und An_1 verantwortlichen Genen sind wahrscheinlich gleich. Das steht in Einklang mit der oben erwähnten Annahme, daß An_7 und An_1 unter dem Einfluß derselben Gene entstehen. Daraus, daß sowohl F als auch K oder M mit einem Faktor für anthocyanhaltigen Pollen gekoppelt sind, kann man außerdem schließen, daß auch F und K bzw. M gekoppelt sind. Dadurch ließe sich auch die Spaltung in einer Nachkommenschaft erklären, in der zu viele Pflanzen mit der Pigmentgruppe An_α den Farbstoff An_1 und zu wenige mit der Pigmentgruppe An_β den Farbstoff An_7 bildeten.

Das Gen k ist mit w gekoppelt. Die Selbstungsnachkommenschaft von T_2U spaltete 93:3:2:21 für Pflanzen ohne An_7 mit weißem Pollen: ohne An_7 mit gelbem

Pollen : mit An_7 mit weißem Pollen : mit An_7 mit gelbem Pollen. Der Rekombinationswert beträgt 4,5% (Fehler: 1,3%). Wenn man annimmt, daß dasselbe Allelenpaar $K-k$ in der oben beschriebenen Nachkommenschaft spaltete, läßt sich das folgende Schema (Schema 2) für die Anordnung der beschriebenen Gene aufstellen.

Das Gen k ist außerdem mit dem Faktor b gekoppelt, der Rekombinationswert konnte aber nicht bestimmt werden.



Schema 2. Anordnung der Gene f , w , K und u in einer Kopplungsgruppe

Dieses Schema kann nur provisorisch sein, da in den beschriebenen Kreuzungen jeweils mehrere Faktoren für die Ausprägung eines Phäns spalteten und nicht immer entschieden werden konnte, welcher gekoppelt war.

Die Selbstungsnachkommenschaft von H 176 spaltete in

61 $D-E$: 7 $D-ee$: 5 ddE : 19 $ddee$ -Pflanzen.

Die Gene D und E sind also mit einem Austauschwert von 13,5% (Fehler: 2,6%) gekoppelt, wahrscheinlich außerdem mit dem Gen a ; aus den gefundenen Daten lassen sich aber keine Rekombinationswerte berechnen.

Das Gen für mosaikartige Pigmentverteilung und ein rezessives Gen für anthocyanfreien Pollen aus Pflanzen der Aussaat-Nr. H 231 sind sehr eng gekoppelt. Von 143 gesprenkelten Nachkommen aus Rückkreuzungen mehrerer F_1 - mit gesprenkelten Pflanzen hatte nur einer blauen Pollen.

Alle Nachkommen der bereits bei der Vererbung der Selbststerilität und der Anthocyan- und Anthoxanthinbildung erwähnten Kreuzung einer F_1 - mit einer weißblühenden F_2 -Pflanze wurden auf ihren Gehalt an S -Genen getestet. Sie spalteten 28:7:19:15 für $S_{10}S_3$ mit weißem : $S_{10}S_3$ mit gelbem : S_3S_3 mit weißem : S_3S_3 mit gelbem Pollen. Aus dem für unabhängige Spaltung errechneten χ^2 von 4,619 und p-Wert von 0,02—0,05 kann man vermuten, S_3 sei mit dem Gen w für gelbe Pollenfarbe gekoppelt. Die Spaltungszahlen sind aber nicht groß genug, um diese Annahme zu bestätigen. In allen übrigen Fällen wurde erst dann die Kopplung zweier Merkmale als sicher betrachtet, wenn der p-Wert für freie Spaltung $< 0,01$ war. Ob man das Selbststerilitätsgen wirklich der in Schema 2 beschriebenen Kopplungsgruppe zuordnen kann, muß noch eingehender geprüft werden.

D. Diskussion

Bevor die Vererbung der Farbstoffbildung besprochen wird, soll die Wirkung der Blütenfarbgene, die oben beschrieben wurden, zusammengefaßt werden.

Das Gen *A* beeinflußt die allgemeine Bildung von Anthocyanen, *B* die von Anthoxanthinen, *C* läßt statt der Anthoxanthingruppe Fl_α die Gruppe Fl_β entstehen, *D* manifestiert sich durch die Bildung des Anthoxanthins Fl_4 in der Gruppe Fl_β , *E* ist für die Synthese des Anthoxanthins Fl_5 notwendig, *F* läßt statt der Anthocyangruppe An_α die Gruppe An_β entstehen, *G* und *H* wirken komplementär auf die Bildung der Gruppe An_γ zusätzlich zu An_β , *K* und *M* blockieren komplementär die Bildung von An_7 in der Gruppe An_β und von An_1 in der Gruppe An_α ; *L* ist für die Synthese des Anthocyans An_6 in der Gruppe An_β und von An_2 in der Gruppe An_α notwendig.

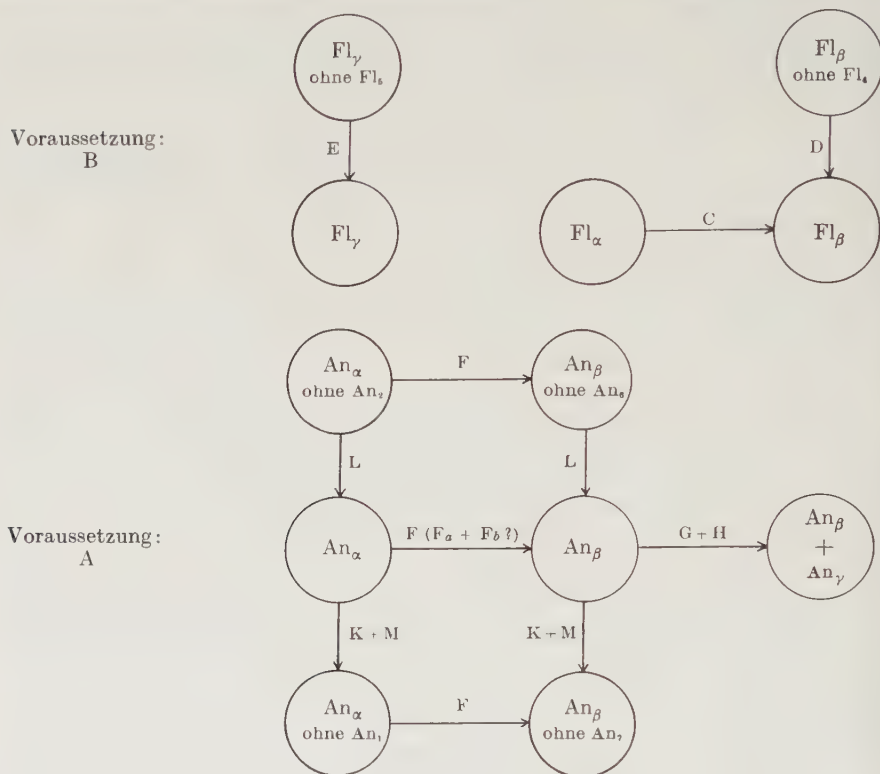
Die in den beschriebenen Kreuzungsnachkommenschaften gefundenen monohybriden Spaltungen für anthocyanhaltige und -freie Pflanzen stimmen mit den Untersuchungen von MALINOWSKI 1916, RASMUSON 1918, STÖRMER und v. WITSCH 1938 und MATHER and EDWARDES 1944 überein. Auch die Tatsache, daß in den Adern der rezessiven Pflanzen Anthocyan auftritt, ist übereinstimmend berichtet worden. Dieser Befund kann nicht überraschen. *Petunia hybrida* ist aus der Kreuzung der beiden Arten *Petunia axillaris* und *Petunia violacea* entstanden. Nach den Beschreibungen von FERGUSON and OTTLEY 1932 und MATHER and EDWARDES 1944 ist *Petunia violacea* purpur gefärbt, während *Petunia axillaris* rosa geädert, im übrigen Teil der Blüte aber weiß ist. Man wundert sich nicht, daß sich in den zwei Arten verschiedene Wege der Anthocyanbildung (einer für das Anthocyan der Adern, ein anderer für das der gesamten Blütenblätter) entwickelt haben, und daß sich diese beiden genetisch festgelegten Wege in den Hybriden überlagern.

In den hier beschriebenen Versuchen wurden auch für anthoxanthinhaltige und -freie Pflanzen monohybride Spaltungen gefunden. Die Gene *A* und *B* spalten und wirken unabhängig voneinander. Das Anthoxanthin *B* muß nicht vorhanden sein, damit sich das Anthocyan *A* manifestieren kann. Das schließt nicht aus, daß Anthocyan und Anthoxanthin aus gemeinsamen Vorstufen entstehen.

Die Unabhängigkeit der Vererbung der Anthocyan- und Anthoxanthinbildung bei Petunien scheint zunächst im Widerspruch zu den Versuchsergebnissen STÖRMERS und v. WITSCHS (1938) zu stehen. Diese Autoren fanden, daß zwischen blaublühenden und flavonolhaltigen cremefarbenen Petunien ein monogener Unterschied bestand. Außerdem fanden sie in den Knospen blaublühender Petunien zunächst Flavonol. Dieses konnte aber nicht mehr nachgewiesen werden, wenn genügend Anthocyan gebildet war. Sie schlossen daraus, daß das Anthocyan der Blütenblätter aus flavonartigen Vorstufen entsteht. Während nach GEISSMAN and HINREINER (1952) für die meisten untersuchten Pflanzen nachgewiesen ist, daß die gelben Anthoxanthine einerseits und Anthocyane andererseits nicht auseinander, sondern aus gemeinsamen Vorstufen entstehen, gilt es nach den Untersuchungen von STÖRMER und v. WITSCH als gesichert, daß die Biosynthese der Anthocyane bei *Petunia* aus Flavonolen erfolgt. Ihre Versuchsergebnisse lassen aber auch eine andere Deutung zu, die nicht im Widerspruch zu den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen steht: In den Knospen der blaublühenden (anthocyan- und anthoxanthinhaltigen) Petunien bildet sich zunächst Anthoxanthin. Dieses wird, sobald Anthocyan entsteht (vielleicht unter Beteiligung von Metallionen), komplex gebunden und ist dann

nach dem Mikrotest von KLEIN (den STÖRMER benutzte) in den Zellen nicht mehr nachweisbar. In den Selbstungsnachkommenschaften blaublühender, für das Gen *A* heterozygoter Petunien waren die von STÖRMER und v. WITSCH gefundenen cremefarbenen Pflanzen auch zu erwarten, wenn die Gene *A* und *B* unabhängig voneinander wirken.

Alle übrigen Gene, die auf die Farbstoffsynthese einwirken, sind in ihrer Manifestation von den Genen *A* oder *B* abhängig. Man kann nicht entscheiden, ob sie bzw. die von ihnen gebildeten Fermente die Veränderung der Pigmente selbst oder ihrer Vorstufen beeinflussen. Auf Grund der im Versuchsteil beschriebenen Abhängigkeiten wurde das folgende Schema für ihre Wirkung aufgestellt.



Schema 3. Modell für die Wirkung der beschriebenen Pigmentgene

Es sei besonders betont, daß damit nur die einfachste Vorstellung wiedergegeben ist, die man sich nach den Versuchsergebnissen von dem formalen Zusammenhang der beschriebenen Gene machen kann. Es ist möglich, daß in den chromatographischen Untersuchungen chemisch verschiedene Stoffe als identisch angesehen wurden, wenn sie gleiche Wanderungsgeschwindigkeiten und ähnliche Lichtabsorption hatten. Außerdem ist es möglich, daß zwei Gene, die gleiche Spaltungszahlen zeigten und dasselbe Phän beeinflussten, als gleich angesehen wurden, obwohl sie verschiedene Schritte steuerten. In manchen Fällen, z. B. für die Bildung der Farbstoffgruppe An_γ zusätzlich zu An_β , ließ es sich durch andere Kreuzungen nachweisen, daß in Wirklichkeit mindestens zwei Gene

beteiligt waren. In anderen Fällen, in denen zwischen verschiedenen Elternpflanzen bisher nur monogene Unterschiede für dasselbe Merkmalspaar gefunden wurden, können ähnliche Verhältnisse vorliegen, so daß man in anderen Kreuzungen kompliziertere Spaltungen erwarten kann. Eine dritte Komplikation liegt darin, daß eng gekoppelte Gene als Allele erscheinen. Dadurch kann z. B. vorgetäuscht werden, daß die Bildung des Farbstoffes An_7 und des Pigmentes An_1 unter dem Einfluß derselben Gene erfolgt.

Nach den Untersuchungen vor allem WILLSTÄTTERS und seiner Mitarbeiter, KARRERS und ROBINSONS liegen die Anthocyane in den Blüten immer, die Anthoxanthine fast immer als Glycoside vor. Außerdem können beide Pigmentklassen Verbindungen mit organischen Säuren eingehen. In zahlreichen Arbeiten sind chemische Veränderungen der Anthocyane nachgewiesen, die durch Gene gesteuert werden. Sie sind in einigen Berichten (SCOTT-MONCRIEFF 1939; LAWRENCE and PRICE 1940; BLANK 1948; GEISSMAN and HINREINER 1952; HALDANE 1954; HARTE 1955; PAECH 1955; BLANK 1958) zusammengefaßt worden. Von folgenden biochemischen Veränderungen, welche die Anthocyanbildung beeinflussen, war nach GEISSMAN and HINREINER bekannt, daß sie unter genetischer Kontrolle standen: die Bildung von Anthocyan, die Bildung von Anthoxanthin als Co-Pigment, die Anthocyankonzentration, der Grad der Oxydation (Zahl der Hydroxylgruppen), der Grad der Methylierung, die Zahl und Stellung der glycosidisch gebundenen Zucker, der p_H -Wert des Zellsaftes.

HARBORNE berichtete 1956 und 1957, daß die Bindung einer Säure an Anthocyan von einem Gen gesteuert wird.

Die Genabhängigkeit der Synthese verschiedener Anthoxanthine ist nicht so gut untersucht (GEISSMAN and MEHLQUIST 1947; STEPHENS 1948; GEISSMAN JORGENSEN and JOHNSON 1954; JORGENSEN and GEISSMAN 1955; SEYFFERT 1955; BÖHME und SCHÜTTE 1956; SHERRAT 1958).

Die chemischen Untersuchungen der oben beschriebenen Farbstoffe sind im Chemischen Institut der Universität Köln in Angriff genommen worden. Ehe sie abgeschlossen sind, kann nicht gesagt werden, welche Schritte von den in dieser Arbeit beschriebenen Genen gesteuert werden. Deshalb wurden die Gene vorläufig nur mit Buchstaben bezeichnet. Ihre endgültige Benennung soll erst erfolgen, wenn die chemischen Formeln der Pigmente bekannt sind. Die Tatsache, daß unter dem Einfluß mancher Faktoren eine Farbstoffgruppe in eine andere umgewandelt wird, und daß andere, von ihnen abhängige Gene auf die Bildung der Einzelpigmente wirken, läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß in einer Blüte (unter dem Einfluß der Faktoren für die Synthese der Einzelpigmente) stets mehrere Glycoside oder Säurederivate eines Anthocyanidins bzw. Anthoxanthins gebildet werden. Durch ein Gen, das eine chemische Reaktion am Grundskelett eines Anthocyanidins oder Anthoxanthins beeinflusst, werden dann gleichzeitig alle Derivate (eine Pigmentgruppe) verändert. Ein Gen, das für die (enzymatische Steuerung der) Bindung eines bestimmten Zuckers oder einer organischen Säure an das Grundskelett verantwortlich ist, muß sich von dem zuerst genannten abhängig manifestieren. Man kann nach den hier angegebenen Spaltungszahlen noch nicht entscheiden, ob wirklich dasselbe oder zwei gekoppelte Gene die Reaktion zwischen derselben Säure bzw. demselben Zucker und zwei verschiedenen, aber ähnlichen Grundmolekülen beeinflussen.

Daß die Pollenfarbe unabhängig von der Blütenfarbe vererbt wird, zeigten schon RASMUSON 1918 und FERGUSON 1934. FERGUSON beschrieb vier Allelenpaare für die Ausbildung der Pollenfarbe: *B-b* für blaue, *Y-y* (das unvollständig dominant ist) für gelbe, *D-d* für graue und *G-g* für grüne Pollenfarbe. Grüner Pollen entstand außerdem durch das Zusammenwirken von *B* und *Y*. TJEBBES fand 1932 eine 3:1-Spaltung für grüne : gelber Pollenfarbe. Nach MÜLLER 1958 ist weiße Pollenfarbe dominant über gelbe (*W-w*). In den hier untersuchten Kreuzungsnachkommenschaften wurden mindestens zwei, wahrscheinlich drei komplementäre Gene für die Vererbung der Anthocyanbildung im Pollen gefunden. Das steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen von RASMUSON, TJEBBES und FERGUSON. In diesen Kreuzungsnachkommenschaften spaltete nur eines der komplementären Gene. Die Diskrepanz zwischen den Angaben FERGUSONS, wonach gelbe Pollenfarbe (unvollständig) dominant über weiße sei, und den Befunden MÜLLERS, daß weiße Pollenfarbe über gelbe dominiert, läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß die Petunien bei verschiedenen Temperaturen herangezogen wurden. In den hier beschriebenen Kreuzungsnachkommenschaften hatten die heterozygoten Pflanzen bei einer Temperatur unter 30° C weißen Pollen, über 32° C bildeten sie gelben Pollen aus.

In Kreuzungsnachkommenschaften können sehr komplizierte Spaltungen dadurch auftreten, daß die Faktoren für die Vererbung der Blüten- und auch der Pollenfarben sich gegenseitig in ihrer Ausprägung beeinflussen und daß einige dieser Gene gekoppelt sind. Deshalb ist es zunächst ungerechtfertigt, ungewöhnliche Phänotypenspaltungen auf Kopplungen der betreffenden Gene mit einem *S*-Gen zurückzuführen. Fast alle der hier beschriebenen, von einfachen Mendelzahlen abweichenden Verhältnisse ließen außer der Erklärung, daß die Störung durch Gonenkonkurrenz bedingt sei, die Alternative zu, daß zwei komplementäre Faktoren, die an der Ausbildung eines Merkmals beteiligt sind, miteinander gekoppelt sind. Eine Kopplung mit einem der Selbststerilitätsfaktoren ist erst dann als sicher anzusehen, wenn die *S*-Gene der betreffenden Pflanzen gleichzeitig mit dem in Betracht kommenden Merkmal festgestellt wurden. Da diese Prüfung sehr zeitraubend ist, erscheint es sinnvoll, zunächst die Kopplungsgruppen festzulegen und dann den *S*-Locus einzuordnen.

Summary

In *Petunia hybrida* some petal pigment genes, some pollen color genes and their linkage have been analysed.

Comparison of paper chromatograms of petal extracts was used for classification of phenotypes. Every petal contains several anthocyanins and/or anthoxanthins. Various individual pigments when produced, always are found in the same petals *with* certain particular pigments, but *not* with others. For this reason the anthocyanins and anthoxanthins which were investigated could each be divided into three groups.

Because of their hierarchical action the petal pigment genes can be put into three classes: The first class contains two factors: the gene *A*, which affects general anthocyanin production, and the gene *B*, which affects general anthoxanthin production. Both genes assort and express themselves independently of each other.

The second class contains genes which influence the synthesis of specific groups of anthocyanins or anthoxanthins. Plants which are homozygous recessive for these genes produce a different pigment group than plants with the dominant allele. The expression of these genes is dependent upon the genes *A* or *B*, i. e. the genes of the first class.

The third class affects the synthesis of the individual pigments. Their expression depends upon the genes which influence the production of the pigment groups, i. e. the genes of the second class. These results are discussed in connection with a formal model of the action of these genes.

Pigment synthesis in anthers is independent of petal pigment genes. Two or three complementary genes segregate for anthocyanin synthesis in pollen, and there is also segregation of two complementary genes controlling the yellow or white pollen color.

Herrn Professor Dr. J. STRAUB danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und für die Überlassung von Versuchsmaterial. Herrn Gartenmeister H. SCHWAMBORN für die Betreuung der Versuchspflanzen, Fräulein Dr. G. KIRCHEISEN, Herrn K.-H. SCHRÖDER, Herrn L. DIERS und Herrn G. BIRMES für zeitweise technische Hilfe. Der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“ bin ich für großzügige finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Literatur

- BENL, G.: Über ein pleiotropes Gen bei *Petunia nyctaginiflora*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre. **83**, 86—92 (1949).
- BLANK, F.: The anthocyanin pigments of plants. Bot. Rev. **13**, 241—317 (1948).
- BLANK, F.: Anthocyanins, flavones, xanthenes. In Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 10, S. 300—353. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1958.
- BÖHME, H., u. H. R. SCHÜTTE: Genetisch-biochemische Untersuchungen über Blütenfarbstoffe an Mutanten von *Antirrhinum majus* L. (I. Mitt.) Biol. Zbl. **75**, 597—611 (1956).
- CORRENS, C., u. H. KAPPERT: Vererbungsversuche mit buntblättrigen Sippen. XII. *Petunia hybrida forma albomutabilis*. S.-B. preuß. Akad. Wiss., phys.-math. Kl. 3—5 (1936).
- DALE, E. E., and W. C. STEERE: Inheritance of elongate-lobed flowers in *Petunia*. Amer. Naturalist **68**, 169 (1934).
- FERGUSON, M. C.: The inheritance of pollen color in *Petunia*. Amer. Naturalist **68**, 167 (1934).
- FERGUSON, M. C.: A cytological and a genetical study of *Petunia* V.. The inheritance of color in pollen. Genetics **19**, 334—411 (1934).
- FERGUSON, M. C.: The inheritance of color-pattern in the corollalimb of two strains of *Petunia* and in their hybrids. Genetics **24**, 72 (1939).
- FERGUSON, M. C., and A. OTTLEY: Studies on *Petunia* III. A redescription and additional discussion of certain species of *Petunia*. Amer. J. Bot. **19**, 385—405 (1932).
- GEISSMAN, T. A.: In K. PAECH u. TRACEY, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 3. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.
- GEISSMAN, T. A., and J. B. HARBORNE: The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus*. IV. The Albino (-mm -nn)-form. Arch. Biochem. **55**, 447—454 (1955).
- GEISSMAN, T. A., and E. HINREINER: Theories of the biogenesis of flavonoid compounds. Bot. Rev. **18**, 77—244 (1952).
- GEISSMAN, T. A., E. C. JORGENSEN and B. L. JOHNSON: The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus*. Color genotypes I. The flavonoid components of the homozygous *P*, *M*, *Y* color types. Arch. Biochem. **55**, 447—454 (1954).
- GEISSMAN, T. A., and G. A. L. MEHLQUIST: Inheritance in the carnation, *Dianthus caryophyllus*. IV. The chemistry of the flower color variation. Genetics **32**, 410—433 (1947).
- HALDANE, J. B. S.: The biochemistry of genetics. London: George Allen & Unwin Ltd. (1954).
- HARBORNE, J. B.: Biochemical genetics of the acylated anthocyanins of tuberous solanums. Biochem. J. **63**, 30 P (1956).

- HARBORNE, J. B.: Variations in the glycosidic pattern of anthocyanins. *Nature* (Lond.) **179**, 429 (1957).
- HARDER, H.: Über die Musterbildung an Petunienblüten. *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl., N.F.* **1**, 5—9 (1934).
- HARDER, R., u. J. MARHEINEKE: Weitere Untersuchungen über die Musterbildung. *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. VI, N.F.* **2**, 97—105 (1935).
- HARTE, C.: Die Wirkung der Gene auf biochemische Vorgänge bei höheren Pflanzen. *Naturwissenschaften* **42**, 199—206 (1955).
- JIMMER, F. R.: Formulae and tables for calculating linkage intensities. *Genetics* **15**, 81—98 (1930).
- JORGENSEN, E. C., and T. A. GEISSMAN: The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus*. II. Glycosides of *PPmmYY*, *PPMMYY*, *ppmmYY* and *ppMMYY* color genotypes. *Arch. Biochem.* **54**, 72—82 (1955).
- JORGENSEN, E. C., and T. A. GEISSMAN: The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus* color genotypes. III. Relative anthocyanins and aurone concentrations. *Arch. Biochem.* **55**, 389—402 (1955).
- KARRER, W.: *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*. Basel: Birkhäuser 1958.
- LAWRENCE, W. J. C., and J. R. PRICE: A survey of anthocyanins. *Biol. Rev.* **15**, 35—58 (1940).
- LEVAN, A.: Studien über die Vererbung der Blütscheckung bei *Petunia*. *Hereditas* (Lund) **25**, 145—184 (1939).
- MALINOWSKI, E. 1916: *Zit. nach MATSUURA* 1933.
- MALINOWSKI, E.: Studies on unstable characters in *Petunia*. I. The extreme flower types of the unstable race with mosaic color patterns. *Genetics* **20**, 342—356 (1936).
- MALINOWSKI, E., and H. BANKOWSKA: Labile characters in *Petunia* and *Phaseolus*. *Bull. Acad. pol. Sci. Cl. 2*, **4**, 263—268 (1956).
- MATHER, K.: *The measurement of linkage in heredity*, 2. Aufl. London 1951.
- MATHER, K., and P. M. J. EDWARDS: Specific differences in *Petunia*. III. Flower color and genetic isolation. *J. Genet.* **45**, 243—260 (1944).
- MATSUURA, H.: A bibliographical monograph on plant genetics. 1900—1929. 2. Aufl. Sapporo 1933.
- MATTHIAS, W.: Serienuntersuchungen mit Hilfe einer neuen Form der Streifen-Papierchromatographie. *Naturwissenschaften* **41**, 17 (1954).
- MÜLLER, I.: Cytogenetische Untersuchungen an Translokations-Heterozygoten von *Petunia hybrida*. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 246—263 (1958).
- PAECH, K.: Color development in flowers. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **6**, 273—299 (1955).
- PARIS, C. D. and W. J. HANEY: Genetic Studies in *Petunia* I. Nine Genes for Flower Color. *Proc. Amer. Hort. Sci.* **72**, 462—472 (1958).
- RASMUSON, 1918: *Zit. nach MATSUURA* 1933.
- ROBINSON, G. M.: Notes on variable colors of flower petals. *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 1605 to 1606 (1939).
- ROBINSON, G. M., and R. ROBINSON: A survey of anthocyanins I. *Biochem. J.* **25**, 1687—1705 (1931).
- ROBINSON, G. M., and R. ROBINSON: A survey of anthocyanins II. *Biochem. J.* **26**, 1647 to 1664 (1932).
- ROBINSON, R.: Über die Synthese von Anthocyaninen. *Ber. dtsch. chem. Ges.* **67**, 85—105 (1934).
- ROBINSON, R., and G. M. ROBINSON: The colloid chemistry of leaf and flower pigments and the precursors of the anthocyanins. *J. Amer. chem. Soc.* **61**, 1605—1606 (1939).
- SCHRÖDER, H.: Untersuchungen über die Beeinflussung des Blütenfarbmusters von *Petunia hybrida grandiflora hort.* *Jb. wiss. Bot.* **79**, 714—752 (1934).
- SCOTT-MONCRIEFF, R.: The genetics and biochemistry of flower color variation. *Ergebn. Enzymforsch.* **8**, 277—306 (1939).
- SEYFFERT, W.: Die Vererbung der Blütenfarben bei hemiploiden *Cyclamen*. *Züchter* **25**, 275—287 (1955).
- SEYFFERT, W.: Über die Wirkung von Blütenfarbgenen bei *Cyclamen*. *Z. indukt. Abstamm.-u. Vererb.-Lehre* **87**, 311—334 (1955).

- SHERRAT, H. S. A.: The relationship between anthocyanidin and flavonols in different genotypes of *Antirrhinum majus*. *J. Genet.* **56**, 28—36 (1958).
- STEPHENS, S. G.: A biochemical basis for the pseudo-allelic anthocyanin series in *Gossypium*. *Genetics* **33**, 191—214 (1948).
- STÖRMER, I., u. H. WITSCH: Chemische und entwicklungsphysiologisch-genetische Untersuchungen über das Blütenfarbmuster der Gartenpetunien. *Planta (Berl.)* **27**, 1—29 (1938).
- TJEBBES, K.: Studien über Fertilität bei *Petunia*-Kreuzungen. *Bot. Notiser* **1932**, 269—277 (1932).
- WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik, 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer (1957).
- WERCKMEISTER, P.: Möglichkeiten und Wege der Farbenzüchtung. *Gartenwelt* **16** (1952).
- WETTSTEIN, F. v., u. K. PIRSCHLE: Über die Wirkung heteroplastischer Pfropfungen und die Übertragung eines genbedingten Stoffes durch Pfropfung bei *Petunia*. *Biol. Zbl.* **58**, 123—142 (1938).
- WILLSTÄTTER, R.: In Justus Liebigs Ann. Chem. **412** (1917). Zit. nach KARRER.
- WITSCH, H. v.: Weitere Untersuchungen zur genetischen Grundlage der Blütenscheckung bei *Petunia hybrida grandiflora*. *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. VI, N.F.* **3**, 203—208 (1939).
- ZINN, F.: Die Genetik der Blütenfüllung bei *Petunia hybr. hort.* und die Züchtung allgefüllter Kultursorten. *Gartenbauwiss.* **12**, 273—321 (1938).

Dr. GISELA MOSIG, Vanderbilt University, Dept. of Biology,
Nashville/Tennessee

Aus dem Biologischen Institut der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Doz. Dr. H.-A. FREYE; damaliger Direktor: Prof. em. Dr. Dr. h.c. P. HERTWIG)

DIE GENETIK EINER NEU AUFGETRETENEN SPONTANEN KURZSCHWANZMUTATION BEI DER HAUSMAUS

Von

KONSTANTIN KUMINEK

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. März 1960)

A. Allgemeiner Teil

I. Einführung

Es werden in dieser Arbeit an einer dominanten Kurzschwanzmutante der Hausmaus aus dem Biologischen Institut Halle (Saale) mit dem Symbol T^{hg} die Erbliehkeitsverhältnisse studiert, nachdem die Arbeitsergebnisse über die Morphologie einschließlich der Diskussion der formalen Genese in einer vorangehenden Veröffentlichung niedergelegt worden sind¹ (KUMINEK 1959).

Zweck der folgenden Ausführung ist:

1. Etwaige Einflüsse peristatischer und besonders genotypischer Art hinsichtlich ihrer quantitativen bzw. qualitativen Wirkung auf die Merkmalsausbildung zu untersuchen. Hierbei liegt die Betonung in der Prüfung auf Letalfaktoren und in der Bearbeitung der Rolle des genotypischen Milieus nach Einkreuzung fremder Stämme.

2. Das im Schrifttum niedergelegte Material über andere Wirbelsäulenmutanten bei der Hausmaus durch erbwissenschaftliche Daten zu ergänzen und damit eine genetische Einordnung der neuen Mutation zu versuchen.

II. Material und Methodik

Es handelt sich bei unserem genetisch untersuchten Stamm um die Nachkommen eines im Biologischen Institut Halle (Saale) von P. HERTWIG 1948 gefundenen kurzschwänzigen Männchens 241 aus dem Stamm der Kreiser (Symbol kr), dessen Vorfahren und Geschwister keine Schwanzverkürzungen besaßen (s. auch KUMINEK 1959).

Das Kardinalsymptom der pathologisch erscheinenden Heterozygoten ($T^{hg}/+$) ist eine verschieden stark ausgebildete Wirbelsäulenreduktion, welche von einer leichten Schwanzverkürzung bis zur lumbalen Wirbelsäulenaplasie auftritt. Daneben findet man häufig Rhachischisis, Luxationen und Lähmungen der hinteren Extremitäten, Rectourogenitalmißbildungen und, seltener, verschiedene andere Skelettanomalien.

Die Benutzung des Symbols T^{hg} für unsere Mutante wird im speziellen Teil begründet; der Index „ hg “ (HERTWIG) wurde auf Anregung von M. F. LYON (1959) gewählt.

Die T^{hg}/T^{hg} -Homozygoten sterben wie die T/T am 10. embryonalen Tage ab, sie treten also in der postpartalen Filialgesamtheit nicht in Erscheinung. Alle pathologischen Tiere sind Heterozygoten. Aus Paarungen phänotypisch normaler Eltern entstehen immer nur normale Jungtiere, so daß dieses neben den gefundenen Spaltzahlen die dominante Vererbung erkennen läßt. Ein Anhalt für einen geschlechtsgebundenen Vererbungsmodus besteht nicht, wenn auch die pathologischen männlichen Wurfgeschwister leicht überwiegen.

¹ Ich bin Frau Prof. HERTWIG, die bis Herbst 1959 Direktor des Biologischen Institutes war, für die Überlassung des Materials und für die Anregung zu dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

Zur Untersuchung der Erbliehkeitsverhältnisse wurden sämtliche Zuchtbücher aus der Zeit vom 1. 9. 48 bis zum 31. 8. 56 auf Würfe vom Kurzschwanzstamm durchgesehen. Es wurden 1151 Würfe mit insgesamt 5984 Neugeborenen gezählt; Schwanzmißbildungen traten bei 3435 Tieren auf (57,40%). Davon waren 1582 weiblich (26,44 bzw. 46,04% auf pathologische Tiere bezogen) und 1821 männlich (30,43 bzw. 53,01%). Bei 32 Tieren (0,54 bzw. 0,93%) war das Geschlecht wegen Urogenitalmißbildungen nicht festzustellen.

Da in diesem Material auch andere Stämme (wie *Oligodactylie*, *Dreher* und *Hydrops*) eingekreuzt vorkommen, wurde es je nach Herkunft geordnet und tabellarisch ausgewertet. Zur Feststellung der Soll-Wurfgröße im Kurzschwanzstamm wurden mit unbelasteten Tieren entsprechende Anpaarungen vorgenommen, deren Wurfsergebnis mit Kurzschwanzwürfen in Beziehung gesetzt wurde.

Die statistische Sicherung erfolgte nach den modernen Methoden, wie sie z. B. bei E. WEBER (1958) angegeben sind.

Bei 154 weiblichen und männlichen Kurzschwanzmäusen aller Altersstufen wurden die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung (KUMINEK 1959) hinsichtlich des Genotyps ausgewertet. Von den 154 Tieren waren 102 nur durch das Gen unseres Kurzschwanzstammes belastet, während die restlichen 52 Mäuse neben der *T^{ho}*-Belastung noch die Merkmale der für *Oligodactylie* Homozygoten aufwiesen.

B. Spezieller Teil

I. Der Erbgang (Prüfung aller Spaltzahlen)

Die Tabelle 1 zeigt eine Aufstellung aller Zahlen geordnet nach Herkunft (Erbformel der Eltern), Phänotyp, Geschlecht, Spaltzahlen und den absoluten und prozentualen Endsummen nebst der theoretischen Erwartung, die einen einfach dominanten Erbgang mit letaler Wirkung des homozygoten dominanten Gens voraussetzt. Die folgenden 5 Spalten dienen der statistischen Auswertung der empirischen Zahlen. Es werden die Mutungsgrenzen und die gefundene statistische Sicherung angegeben. Zur Berechnung dieser Werte wurde die *u*-Verteilung (standardisierte Normalverteilung bei größeren Stichproben) verwendet. Es gilt die Beziehung

$$u = \frac{Z - P}{\sqrt{P \cdot Q}} \cdot \sqrt{N}$$

wobei

$$Z = \frac{100 \cdot z}{N}$$

ist.

Für die Mutungsgrenzen ist

$$Z_{m \pm} = P \pm 2,57 \cdot \sqrt{\frac{P \cdot Q}{N}}$$

in % ausgedrückt und

$$z_{m \pm} = \frac{Z_{m \pm} \cdot N}{100}$$

in absoluten Zahlen.

- u* = für eine statistische Sicherheit von 99% = 2,57
- Z* = prozentuale Eintreffenshäufigkeit in Stichprobe
- z* = absolute Eintreffenshäufigkeit in Stichprobe
- P* = prozentuale Eintreffenshäufigkeit in Grundgesamtheit
- p* = absolute Eintreffenshäufigkeit in Grundgesamtheit
- Q* = prozentuale Nichteintreffenshäufigkeit in Grundgesamtheit

Tabelle 1.

Spalte	1	2	3	4	5	6
Zeile	Eltern	Genotyp und Phänotyp	Zahl der Nachkommen			
			σ	Geschlecht unbestimmt	φ	Summen absolut = %
A	$Thg/+ \times normal$	$Thg/+$ gefd. theor.	636 (648)	17	703 (698)	1356 = 50,06 (1354,5 = 50)
		$normal$ gefd. theor.	660 (648)	—	693 (698)	1353 = 49,04 (1354,5 = 50)
		Gesamt	1296	17	1396	2709 = 100
B	$Thg/+ \times Thg/+$	$Thg/+$ gefd. theor.	802 (821,3)	9	906 (899,3)	1717 = 66,3 (1726,6 = 66,6)
		$normal$ gefd. theor.	430 (410,6)	—	443 (449,6)	873 = 33,6 (863,3 = 33,3)
		Gesamt	1232	9	1349	2590 = 100
C	$Thg/+^{+}/dr \times normal$	$Thg/+$ gefd. theor.	37 (41,5)	—	64 (53)	101 = 53,4 (94,5 = 50)
		$normal$ gefd. theor.	46 (41,5)	—	42 (53)	88 = 46,6 (94,5 = 50)
		Gesamt	83	—	106	189 = 100
D	$Thg/+^{+}/dr \times Thg/+^{+}/dr$	$Thg/+$ gefd. theor.	31 (27,3)	—	25 (26)	56 = 70 (53,3 = 66,6)
		$normal$ gefd. theor.	10 (13,6)	—	14 (13)	24 = 30 (26,6 = 33,3)
		Gesamt	41	—	39	80 = 100
E	$Thg/+ Hy \times normal$	$Thg/+$ gefd. theor.	73 (88)	3	115 (102,5)	191 = 49,75 (192 = 50)
		$normal$ gefd. theor.	103 (88)	—	90 (102,5)	193 = 50,25 (192 = 50)
		Gesamt	176	3	205	384 = 100
F	$Thg/+ Hy \times Thg/+ Hy$	$Thg/+$ gefd. theor.	3 (5,3)	3	8 (14)	14 (21,3)
		$normal$ gefd. theor.	5 (2,6)	—	13 (7)	18 (10,6)
		Gesamt	8	3	21	32
						5984

q = absolute Nichteintreffenshäufigkeit in Grundgesamtheit

Z_{m+} = prozentuale obere Mutungsgrenze

Z_{m-} = prozentuale untere Mutungsgrenze

z_{m+} = absolute obere Mutungsgrenze

z_{m-} = absolute untere Mutungsgrenze

Die Z_m - bzw. z_m -Werte zeigen die Grenzen an, unter oder über welchen gerade eben bei einer 99%igen Sicherheit eine Signifikanz zu Z bzw. z besteht; ein u -Wert kleiner als 2,57 besagt, daß diese Abweichung mit nur 1%iger Irrtumswahrscheinlichkeit als zufällig anzusehen ist.

Eine kurze Betrachtung der Tabelle 1 bestätigt unsere Annahme, daß sich die Kurzschwänzigkeit unseres Stammes monogen dominant mit letaler Wirkung

Gesamtübersicht

7	8	9	10	11	12
Wurfzahl			u -Wert $u_{\text{theor.}}^{99} = 2,57$	Mutungsgrenzen	
				absolut	in %
	$Z = 50,06\%$ $P = 50\%$ $Q = 50\%$ $N = 2709$	$z = 1356$ $p = 1354,5$ $q = 1354,5$	$u = 0,078$ N. S.	$z_{m+} = 1409$ $z_{m-} = 1282$	$Z_{m+} = 52,48$ $Z_{m-} = 47,52$
474					
	$Z = 66,3\%$ $P = 66,6\%$ $Q = 33,3\%$ $N = 2590$	$z = 1717$ $p = 1726,6$ $q = 863,3$	$u = 0,356$ N. S.	$z_{m+} = 1784$ $z_{m-} = 1661$	$Z_{m+} = 68,9$ $Z_{m-} = 64,2$
535					
	$Z = 53,4\%$ $P = 50\%$ $Q = 50\%$ $N = 189$	$z = 101$ $p = 94,5$ $q = 94,5$	$u = 0,934$ N. S.	$z_{m+} = 112,5$ $z_{m-} = 76,8$	$Z_{m+} = 59,38$ $Z_{m-} = 40,62$
27					
	$Z = 70,0\%$ $P = 66,6\%$ $Q = 33,3\%$ $N = 80$	$z = 56$ $p = 53,3$ $q = 26,6$	$u = 0,644$ N. S.	$z_{m+} = 64,2$ $z_{m-} = 42,4$	$Z_{m+} = 80,2$ $Z_{m-} = 53,0$
16					
	$Z = 49,75\%$ $P = 50\%$ $Q = 50\%$ $N = 384$	$z = 191$ $p = 192$ $q = 192$	$u = 0,098$ N. S.	$z_{m+} = 217$ $z_{m-} = 166,3$	$Z_{m+} = 56,59$ $Z_{m-} = 43,41$
91					
8					
1151					

auf die Homozygoten vererbt. Denn die Zeile A (Kreuzung des heterozygoten Kurzschwanzes mit normal) ergibt eine Aufspaltung von 50,06% Kurzschwänzen zu 49,04% Normalen, welche sehr nahe den Erwartungswerten liegen. Dieses Ergebnis stützt sich auf die hohe Zahl von 2709 Tieren. Durch den u -Test ist die Homogenität nachhaltig bewiesen. Die Mutungsgrenzen sind bei weitem nicht überschritten.

In der Zeile B sind die Ergebnisse der Kreuzung von zwei für das T^{th} -Gen heterozygoten Eltern zusammengestellt. Das Ergebnis von 66,3% Kurzschwänzen entspricht recht genau einem 2:1-Verhältnis, wie es die Annahme eines die Embryonen ausmerzenden Letalfaktors erfordert. Das empirische Ergebnis ist gleichfalls sehr nahe dem Erwartungswert. Die Gesamtzahl der Tiere ist mit 2590 groß.

Die Absterbeannahme wird weiter bestätigt durch die Feststellung, daß die Kurzschwänze, untereinander gepaart, nicht rein züchten, sondern stets zu einem Drittel normale Tiere werfen; ferner durch die beobachtete Herabsetzung der Wurfgröße (vgl. Tabelle 4) und durch Sektionsergebnisse, auf die weiter unten eingegangen wird. Die Zeilen C—F wiederholen den Rückkreuzungs- und F_1 -Typ der Zeilen A und B. Jedoch sind die Kurzschwänze jetzt nicht mehr nur für T^{hg} -heterozygot, sondern in den Zeilen C und D gleichzeitig für das *Dreher*-Gen und in den Zeilen E und F für den *Hydrops*-Genotyp belastet.

Der in den Kurzschwanzstamm eingekreuzte „*dr*“-Stamm wurde genetisch von FALCONER-ROTH (1951) untersucht. Das Gen „*dr*“ bewirkt homozygot ein Kreiseln der *dr/dr*-Tiere, das auf Labyrinthstörungen zurückzuführen ist (FISCHER 1956, 1958). Der Erbgang ist einfach recessiv. Die *dr/dr*-Mäuse sind relativ gut lebensfähig, ihre Sterblichkeit interferiert nicht mit unseren bei der Geburt registrierten Zahlen.

Wie die Zeilen C und D zeigen, bestehen zwischen A und C sowie B und D keine besonderen Unterschiede. Entsprechend den kleineren Gesamtzahlen 189 und 80 streuen auch die gefundenen Werte für die Pathologischen etwas mehr. Der *u*-Test und die Mutungsgrenzen sichern jedoch die Homogenität.

Die Mitbelastung mit dem *Dreher*-Gen beeinflußt nicht die quantitative Manifestation des T^{hg} -Gens. Die Ergebnisse der Einkreuzung mit dem *Hydrops*-Stamm sehen wir in den Zeilen E und F.

Der *Hydrops*-Stamm wurde von P. HERTWIG 1955 beschrieben. Der Erbgang der *Hydrops*-merkmale deutet auf eine Translokation hin. Die pränatale Sterblichkeit und damit eine Herabsetzung der Wurfgröße ist sowohl bei Rückkreuzungen als auch bei F_2 -Würfen groß.

Die Werte der Zeile E sind bei einer mittelhohen Gesamtzahl (384) mit 49,75% Kurzschwanztieren sehr zufriedenstellend. Anders in Zeile F: Die Gesamtzahl ist nur klein (32). Die Kurzschwanzmäuse sind sichtlich dezimiert. Anstatt der erwarteten 21 Tiere sind nur 14 Tiere kurzschwänzig. Die Wurfgröße ist mit 4 sehr niedrig und weist auf das intrauterine Absterben von wahrscheinlich mehr Kurzschwanzmäusen hin. Anscheinend sind es auch hier genische Gründe, die diese Übersterblichkeit beeinflussen. Die Erörterung dieser Inkongruenz hat erst nach Erarbeitung eines größeren Materials einen Wert. Daher ist auch auf die Prozentberechnung und auf den *u*-Test bewußt verzichtet worden.

Die Gesamtzahl von 5984 erfaßten Tieren bei 1151 Würfen (vgl. Tabelle 1) veranschaulicht den Grad der Sicherheit der daraus zu ziehenden genetischen Schlüsse.

II. Vergleich reziproker Kreuzungen

Um die Abhängigkeit der Zahl der pathologischen Nachkommen von der Seite der Eltern, welche selbst Erbträger der Eigenschaft sind, zu untersuchen, wurden reziproke Kreuzungen zwischen $T^{hg}/+$ und $+/+$ vorgenommen.

Hier besteht kein Anhalt für das Vorliegen eines „maternal effect“, wie es beim Gen „*Fused*“ in Erscheinung tritt. Die Aufspaltung in den reziproken Kreuzungen ist gleich. Die beiden Ergebnisse für pathologische Tiere der reziproken Kreuzung 50,6 und 49,4% stimmen fast völlig überein. Auch überwiegen weder die weiblichen noch die männlichen schwanzverkürzten Nachkommen,

Tabelle 2. Reziproke Kreuzungen von $T^{hg}/+$ mit $+/+$ (Die 100%-Werte gelten als Beziehungszahlen für die Berechnung der pathologischen Tiere)

Eltern		Normale und pathologische F_1 -Tiere				Nur pathologische F_1 -Tiere			
♀	♂	♀	♂	gesamt		♀	♂	gesamt	
$+/+ \times T^{hg}/+$		705 (100%)	9	736 (100%)	1450	355 (50,3%)	9	370 (50,3%)	734
				(100%)					(50,6%)
$T^{hg}/+ \times +/+$		591 (100%)	8	660 (100%)	1259	281 (47,6%)	8	333 (50,2%)	622
				(100%)					(49,4%)
Summe		1296 (100%)	17	1396 (100%)	2709	636 (49,1%)	17	703 (50,3%)	1356
				(100%)					(50,06%)

wenn man sie in Beziehung zu ihren Gesamtzahlen setzt, die einen geringen Männchenüberschuß zeigen.

Auch für die Mitbelastung durch den Dreher-Stamm ist eine reziproke Kreuzung durchgeführt worden:

Tabelle 3. Reziproke Kreuzungen von $T^{hg}/+$ Tieren, die gleichzeitig heterozygot für das Dreher-Gen sind, mit Normalen

Zeile	Eltern ♀ ♂	Normale und pathologische F_1 -Tiere			Nur pathologische F_1 -Tiere		
		♀	♂	gesamt	♀	♂	gesamt
A	$\text{normal} \times T^{hg}/++/dr$	60 (100%)	62 (100%)	122	24 (40%)	40 (64,5%)	64
				(100%)			(52,4%)
B	$T^{hg}/++/dr \times \text{normal}$	23 (100%)	44 (100%)	67	13 (56,5%)	24 (54,7%)	37
				(100%)			(55,2%)
C	Summe	83 (100%)	106 (100%)	189	37 (44,6%)	64 (60,4%)	101
				(100%)			(53,4%)

Diese Zahlen sind etwas kleiner und daher ist die Abweichung der $T^{hg}/+$ -Tiere in der Zeile B größer. In Zeile A sind die männlichen Neugeborenen auch relativ bedeutend stärker (64,5%) betroffen. Diese Tatsache wirkt sich trotz eines leicht gegensätzlichen Verhältnisses in Zeile B bei kleineren Zahlen auf das Endverhältnis 44,6:60,4 (%) aus; der Mittelwert hierzu ist gleichzeitig der Anteil der $T^{hg}/+$ -Tiere am Ganzen, nämlich 53,4%.

III. Wurfgrößenvergleiche

Zur Bekräftigung des statistisch gesicherten Ergebnisses einer 2:1-Spaltung als Ausdruck der homozygoten Letalität unseres T^{hg} -Faktors wurden Wurfgrößenvergleiche durchgeführt.

Die Wurfgröße, d.h. die Zahl der geworfenen Tiere pro Wurf, unterliegt sehr vielen modifizierenden Einflüssen. Einmal spielt das Alter der Mutter eine Rolle: ganz junge und ganz alte Weibchen erzeugen kleinere Würfe (MURRAY 1934,

zit. bei GRÜNEBERG 1952). Dann ist die Ordnungszahl des Wurfes des Individuums wesentlich, denn die Wurfgröße zeigt ein Maximum beim 3.—5. Wurf (BITTER 1936, zit. bei GRÜNEBERG 1952). Natürlich spielt die pränatale Mortalität eine ausschlaggebende Rolle, da intrauterin wirkende Letalfaktoren (HADORN 1955) einen Anteil der Früchte zum frühen Tode und zur Resorption bringen lassen. Daneben kann die Ovulationsrate unterschiedlich sein. Außerdem sind die Wurfgrößen je nach Jahreszeit und nach Qualität und Quantität des Futters unterschiedlich. Schließlich bestehen Wurfgrößenunterschiede bei verschiedenen Stämmen. Zu diesen angeführten Modifikatoren der Wurfgrößen kommen noch die Fehlermöglichkeiten durch das Auffressen einiger Neugeborenen durch die Mutter vor der Zählung und endlich eigentliche Zählfehler bei der Registrierung. Die folgenden Wurfgrößen werden als arithmetische Mittelwerte über verschiedene Wurfzahlen angegeben.

Tabelle 4. Veränderung der Wurfgröße durch Oligodactylie

Zeile	Spalte	1	2	3	4	5	6
	Kreuzungstyp	$T^{hg}/+ \times T^{hg}/+$		$T^{hg}/+ \times +/+$		$+/+ \times +/+$	
	Mitbelastung für Oligodactylie	Kontrollen					
		Wurf- größe	Wurf- zahl	Wurf- größe	Wurf- zahl	Wurf- größe	Wurf- zahl
A	$+/o \times +/o$	5,02	101	5,64	136	—	—
B	$+/o \times +/+$	4,93	131	5,75	88	—	—
C	keine	4,74	303	5,74	250	7,55	27
D	Summe		535		474		27
	Mittelwert: absolut in %	4,83 (84,5)		5,72 (100)		7,55	

Die Prozentzahlen für die durchschnittliche Wurfgröße in den Zeilen A, B, C und D, Spalte 1, sind zu hoch, denn nach der Erwartung müßten sie 75% der Wurfgröße 5,72 beim Rückkreuzungstyp, also 4,28 betragen, wenn 25% als letale Homozygoten absterben. Nun ist es auch möglich, daß die Bezugswahlen (Spalte 3), die hier für 100% gesetzt werden, schon reduziert sind. Die Wurfgröße bei $T^{hg}/+ \times +/+$ Anpaarungen müßte $6,44 = 100\%$ erreichen, damit $4,83 = 75\%$ wären. Da es keine normale Zahlen, die für alle Stämme gelten, für die Wurfgröße aus oben angeführten Gründen geben kann, mußte die durchschnittliche Wurfgröße unseres T^{hg} -Stammes durch Anpaarung normaler Tiere dieses Stammes ermittelt werden.

In der 1. Spalte der Tabelle 5 werden die durchschnittlichen Wurfgrößen eines Kontrollversuchs, in dem beide Eltern aus dem Kurzschwanzstamm kommen, aber phänotypisch normal sind, aufgeführt. Zu dieser Zahl werden nur Würfe hinzugerechnet, in welchen kein Kurzschwanz auftritt, denn als Kriterium für die genotypische Reinheit gilt das Fehlen von Kurzschwänzen in eben diesen Würfen. Ist diese Wurfzahl im Verhältnis zu den Versuchszahlen auch kleiner, so ist der Unterschied von 7,55:5,72 doch recht auffallend.

Weiterhin wird unser Ergebnis des Kontrollversuches (7,55) durch Zahlen aus 112 Sektionen von trächtigen Weibchen (P. HERTWIG, noch veröffentlicht),

in welchen die Befruchtungsgröße bei $T^{hg}/+ \times +/+$ und bei $T^{hg}/+ \times T^{hg}/+$ 7,5 beträgt, gestützt.

Setzt man also die Prozentzahlen auf 7,55 = 100%, so ergibt sich folgende Berechnung für die Daten aus Tabelle 4:

Tabelle 5. *Kurzschwanz allein, durchschnittliche Wurfgrößen*

1	2	3
$+/+ \times +/+$	$T^{hg}/+ \times +/+$	$T^{hg}/+ \times T^{hg}/+$
7,55 = 100%	5,72 = 75,9%	4,83 = 64%

Diese neuen Prozentzahlen der Spalten 2 und 3 sind zu niedrig. Die Möglichkeit der Erklärung dieser gestörten Verhältnisse durch von der Mutter ausgemerzte pathologische Neugeborene entfällt, da bei der Analyse der Spaltzahlen das 1:1- bzw. 2:1-Verhältnis gut bewahrt bleibt.

Es scheint also noch ein zweiter Faktor bei den $T^{hg}/+$ -Tieren zu existieren, der das intrauterine Absterben auch der Normalen und Heterozygoten bewirkt. Dieses Problem bleibt einer künftigen embryologischen Untersuchung vorbehalten.

Auch bei Einkreuzung von „Drehern“ wurde die Wurfgröße im T^{hg} -Stamm bestimmt:

Tabelle 6. *Kurzschwanz kombiniert mit „Dreher“, durchschnittliche Wurfgrößen*

	$T^{hg}/+ +/dr \times T^{hg}/+ +/dr$		$T^{hg}/+ +/dr \times \text{normal}$	
	Wurfgröße	Wurfzahl	Wurfgröße	Wurfzahl
Absolut	5,0	16	7,0	27
In %	(71,5)		(100)	

Der Dreher-Stamm (*dr*) zeichnet sich durch ansehnliche Wurfgrößen aus. Mit Rücksicht auf die kleineren Stichproben ist die Senkung der Wurfgrößen bei doppelbelasteten Neugeborenen auf 71,5% befriedigend.

IV. Nachweis der absterbenden Embryonen auf Grund von Sektionsergebnissen

Das nach der Analyse der Spaltzahlen und der Wurfzahlen erwartete Absterben von Früchten im Embryonalalter wird durch Sektionsergebnisse von

P. HERTWIG (1952 bis 1953, unveröffentlicht), bestätigt. Eine spätere eingehendere Bearbeitung ist vorgesehen. Die bei den Sektionen gefundenen, nichtentwicklungsfähigen bzw. toten Embryonengliedern sich in 3 Klassen. Einerseits in Embryonen, die etwa am 9.—10. Tage nach der Befruchtung absterben. Diesen Embryonen fehlt das hintere Körperende, sie haben keinen Allantois- und Nabelgefäß-Kreislauf. Genetisch sind sie die

Tabelle 7. *Sektionen gravider Weibchen am 9.—12. Tage*

1	2	3	4	5	6	7
Alter der Embryonen	Zahl der Sektionen	Nidationszahl (4.—7.)	Normale Embryonen	T^{hg}/T^{hg} -Typ der Embryonen	Kleine abgestorbene Embryonen	Insertionsstellen
9	7	53	37	16	—	—
10	6	53	35	10	2	6
11	7	57	38	4	10	5
12	3	21	16	—	4	1
9—12	23	184	126	30	16	12

Homozygoten T^{hg}/T^{hg} -Typen (Tabelle 7, Spalte 5). Sie weisen eine große Ähnlichkeit mit den T/T -Embryonen auf (s. Abb. 1). Abgesehen hiervon sind aber noch klein gebliebene tote Embryonen (Spalte 6) und sehr früh in der Entwicklung abgestoppte Keimreste (Spalte 7) zu finden. Letztere erscheinen bei der Sektion als hypoplastische Plazenten. Es ergaben sich bei Sektionen am 9. bis 12. Tage nach der Befruchtung als Ergebnis der Elternkombination $T^{hg}/+ \times T^{hg}/+$ die Werte der Tabelle 7.

Das Wurfesoll auf Grund der Nidationszahl müßte $184:23 = 8$ betragen. Unter der Voraussetzung, daß die 126 bis zum 12. Tage als normal bezeichneten Embryonen sich alle weiter normal entwickeln, wäre die voraussichtliche Wurfgröße $126:23 = 5,4$.

Die T^{hg}/T^{hg} letalen Embryonen müßten theoretisch zu den Normalen im Verhältnis 3:1 auftreten, d.h. statt 30 wären 39 zu erwarten. Es ist also

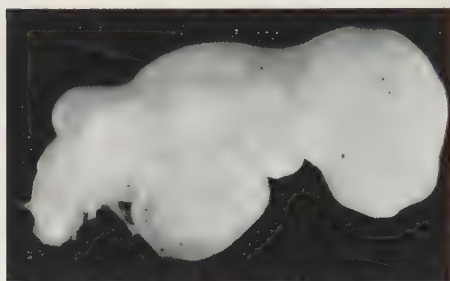


Abb. 1. Durch Sektion am 10. Tage gewonnener homozygoter T^{hg}/T^{hg} -Typ. Eltern: $T^{hg}/+ \times T^{hg}/+$. Unterhalb des normal ausgebildeten Kopfes mit anschließenden Kiemenbögen erkennt man den sich vorbuchtenden Herzbeutel mit Inhalt. Darauf folgt ein rudimentär ausgebildeter Unterkörper.

Die Wirbelsäule reicht nur etwa bis zum Brustbereich

wahrscheinlich, daß unter den in Spalte 7 gebrachten Befunden auch einige der T^{hg}/T^{hg} -Letalen registriert wurden. Im übrigen zeigt die Tabelle 7, wie die vorangegangene Wurfgrößenanalyse auch schon ergab, daß noch andere, die Wurfgröße herabsetzende Faktoren vorhanden sind, denn die Embryonen der Spalte 6 sind sicher nicht mit den charakteristischen T^{hg}/T^{hg} -Embryonen zu verwechseln.

V. Einflüsse verschiedener Genotypen auf die Manifestation der Kurzschwanzmerkmale

Abgesehen von den Dreher- und Hydropsstämmen, deren vorhandener

bzw. fehlender Einfluß auf die Spaltzahlen schon besprochen wurde (Tabelle 1), ist auch das Gen für Oligodactylie in den Kurzschwanzstamm T^{hg} eingekreuzt worden. Auch die oligodactylen Mäuse zeigen Schwanzverkürzungen, Rippenzahlverminderungen und Defekte der hinteren Körperregion, besonders Hydro-nephrose und Atresia ani (P. HERTWIG 1942). Es lag also nahe, zu vermuten, daß die beiden Gene, miteinander kombiniert, den Phänotyp beeinflussen würden.

Unter dem Gesichtspunkt des verschiedenen Genotyps werden auf der Abb. 2 die Zahlen der Wirbeldefekte von 154 Tieren nach Art der Stufendiagramme dargestellt. Ihre Morphologie wurde von mir 1959 beschrieben.

Auf der Abb. 2 gibt die Ordinate die Wirbelzahl an. Sie besitzt in ihrem oberen Teil fallend angeordnete Ziffern. Dagegen sind auf der Abszisse die einzelnen Segmente der Wirbelsäule nach Abschnitten geordnet bezeichnet. Die Ordinate ist ungleich zweischenkelig mit einem Drehpunkt an der im unteren Drittel verlaufenden Grenzlinie in den Werten 52 bzw. 102. Diese Besonderheit ergibt sich zwangsläufig aus der zwecks deutlicheren Anschauung gewählten Spiegelbildform des Diagramms. Die eng gestrichelten Säulen veranschaulichen

die Zahl der pathologischen Wirbel, die weitgestrichelten dagegen repräsentieren die fehlenden Wirbel. Die Zahl der normalen Wirbel in jedem Segment wird durch die jeweilige Ergänzung zur mittleren Waagerechten angegeben. Im unteren Teil a sind nur die 52 Tiere erfaßt, welche außer der Th^{hg} -Belastung noch homozygot für Oligodactylie sind.

Spiegelbildlich zu diesem Teilmaterial a ist das Teilmaterial b darüber angeordnet. Hier sind es 102 nur für Th^{hg} heterozygote Tiere. Der Vergleich beider Kurven zeigt eventuelle Unterschiede an, die durch den verschiedenen Genotyp bedingt sein könnten.

Die Basis der Kurve für die pathologischen Wirbel in der Abb. 2a ist breiter, auch zeigt sie anstatt einer ausgesprochenen Gipfelbildung mehr ein Plateau zwischen L 2 und S 4, d.h. die Streubreite der Mißbildungen ist etwas größer und die Verteilung dieser etwa gleichmäßig auf einen Wirbelsäulensektor. Die entsprechende Kurve in der Abb. 2b ähnelt wieder mehr der Gausschen Normalverteilung. Die Zahl der mißbildeten Wirbel im Schwanzbereich ist nicht nur absolut, sondern auch zweifelsohne relativ größer.

Die Kurven für das Wirbelfehlen zeigen einen deutlichen Unterschied. In der Abb. 2a nähert sich diese Kurve schon viel früher (etwa beim 3. Schwanzwirbel) der Grenzlinie als die zugehörige Kurve in der Abb. 2b. Das bedeutet eine stärkere Schwanzreduktion bei den oligodactylen $Th^{hg}/+$ -Tieren.

In der Abb. 3, welche die Zahlen der Abb. 2a und 2b in Prozentwerten als Säulenkurven übereinander angeordnet bringt, sehen wir noch deutlicher die auf der Abb. 2a und 2b ersichtlichen Differenzen.

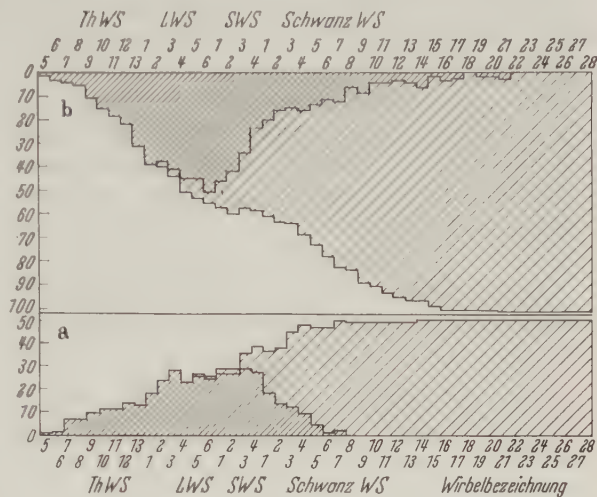


Abb. 2a u. b. Absolute Zahlen aller pathologischen Wirbel aufgespalten nach der Herkunft. a Bei oligodactylen $Th^{hg}/+$. b Bei reinen $Th^{hg}/+$. ■ Mißgebildete Wirbel; ▨ fehlende Wirbel; weiß = normale Wirbel

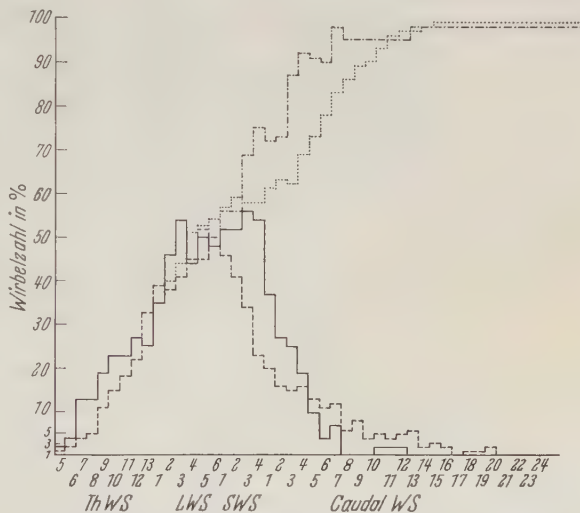


Abb. 3. Prozentzahlen zu Abb. 2. Zu Abb. 2a: — mißgebildete Wirbel; - - - fehlende Wirbel. Zu Abb. 2b: — mißgebildete Wirbel; - - - fehlende Wirbel

Wie im Brustwirbelsäulenbereich, so auch besonders in der Region des Kreuzbeines und der ersten 4 Caudalwirbel ist der Prozentsatz der mißbildeten Wirbel bei oligodactylen $T^{hg}/+$ -Tieren größer, ja bei S 4 gibt es prozentuell mehr als doppelt soviel mißbildete Wirbel bei o/o $T^{hg}/+$ -Mäusen als bei den reinen Kurzschwänzen.

Entsprechend unseren Erwartungen dominieren die $T^{hg}/+$ -Tiere bei den mißbildeten Wirbeln der mittleren Schwanzwirbelsäule. Der Unterschied der Abb. 2a und 2b in bezug auf das Wirbelfehlen kommt hier auch klarer zur Darstellung. Schon ab S 3 steigt die Kurve für die oligodactylen Kurzschwänze schneller an und erreicht bei Caudal 3 und 4 87 bzw. 92%, während die Kurve der reinen Kurzschwänze noch 62 bzw. 69% anzeigt.

In der Tabelle 8 sind die Gesamtzahlen der pathologischen und fehlenden Wirbel bei Oligodactylen mit Kurzschwanzbelastung und bei reinen Kurzschwanzmäusen bis zum 7. Schwanzwirbel einschließlich, eingetragen worden.

Da es nur 52 oligodactyle $T^{hg}/+$ -Tiere sind, also 33% von allen 154 Tieren, müßten die Zahlen bei angenommener Gleichheit im Verhältnis 1:2 stehen. Die theoretischen Erwartungszahlen sind in Klammern beigefügt worden, die gewonnenen Werte sind aber bei den doppelt belasteten Tieren höher, und nun ist es die Aufgabe, den entstandenen Unterschied zu prüfen, um über die Signifikanz der Differenz Aussagen machen zu können. Dies geschieht mit Hilfe der „ 2×2 -Tafel“.

Tabelle 8. „ 2×2 “-Tafel für pathologische und fehlende Wirbel bei reinen und oligodactylen $T^{hg}/+$ Tieren

	o/o $T^{hg}/+$ Tiere	$T^{hg}/+$ Tiere	Summe
Pathologische Wirbel			
gefunden	381 = a	569 = b	950 = a + b
theoretisch	(313)	(637)	
Fehlende Wirbel			
gefunden	270 = c	495 = d	765 = c + d
theoretisch	(252)	(513)	
Summe	651 = a + c	1064 = b + d	1715 = N

$$\chi^2 = \frac{[(a \times d) - (b \times c)]^2 \times N}{(a + b) \times (c + d) \times (a + c) \times (b + d)} \quad n = 1;$$

$$\chi^2 = 8,88 \quad P = 0,01;$$

$$\chi_{\text{theor}}^{2(1)} = 6,63;$$

Also besteht ein signifikanter Unterschied bei einer statistischen Sicherheit von 99% zwischen den beiden Mäusegruppen in bezug auf die pathologischen und fehlenden Wirbel bis zum 7. Schwanzwirbel. Diese Unterschiede bei zuzüglicher Berücksichtigung der Folgerungen aus den Abb. 2 und 3 erhärten die Aussage, daß die Oligodactylie in homozygoter Form die Manifestation der beschriebenen Mißbildungen erhöht.

Auf den Abb. 4a und 4b werden Wirbelkörpermißbildungen bei oligodactylen $T^{hg}/+$ -Tieren mit jenen bei reinen $T^{hg}/+$ -Mäusen verglichen. Auch hier ist das Spektrum der betroffenen Segmente bei den oligodactylen $T^{hg}/+$ -Tieren breiter. Im Bereiche beider Scheitelpunkte entsprechen sich etwa die Kurven, während vom 2. Sacralwirbel an ein gut sichtbares Überwiegen dieser Spaltbildungen in

Abb. 4a angezeigt wird, zumal auch hier das 2:1-Verhältnis gilt. Wenn man die absoluten Zahlen der Säulenkurve in Abb. 4a in Prozent auf die Gesamtsumme beider Werte eines jeden Segmentes berechnet, so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 9. Prozentzahlen für Wirbelkörpermißbildungen bei $T^{hg}/+$ o/o Mäusen

Wirbel	Brustwirbelsäule							Lendenwirbelsäule					
	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
% gefunden	100	100	65	65	50	33	40	25	27	32	40	37	35

Wirbel	Kreuzbein				Schwanzwirbelsäule				
	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.	5.
% gefunden	36	57	61	69	56	100	0	66	66

Wegen zu kleiner Zahl an beiden Enden der Reihe wird nur der Bereich von Th 11 bis Caudal 1 berücksichtigt, obwohl die Anfangs- und Endzahlen die größere Streuung des Betroffenseins der Wirbelsäule durch die Mißbildung bei

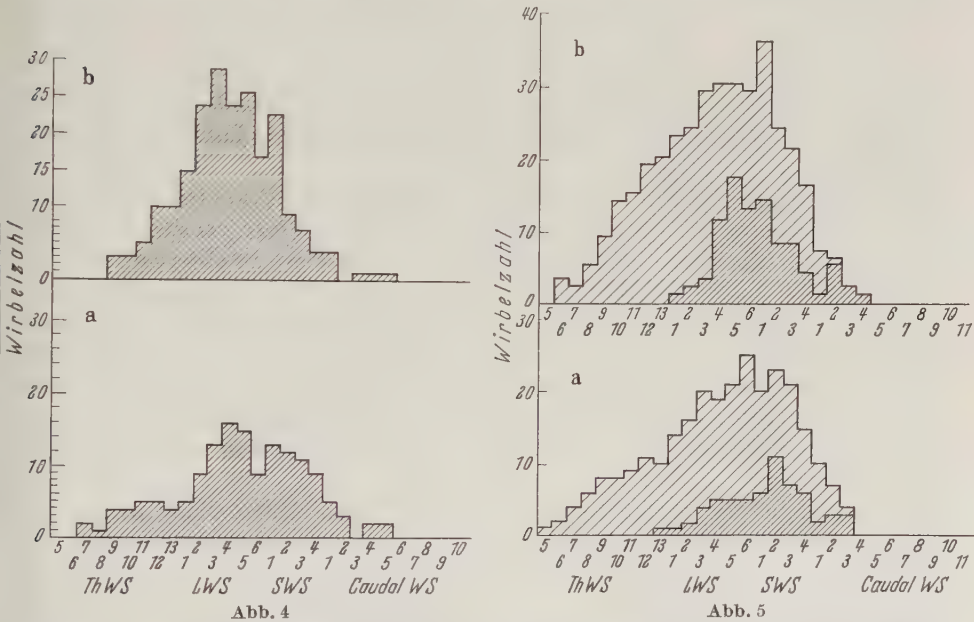


Abb. 4a u. b. Wirbelkörperspaltsmißbildungen. a bei oligodactylen $T^{hg}/+$; b bei reinen $T^{hg}/+$
Abb. 5a u. b. Wirbelbogenspaltsmißbildungen. a bei oligodactylen $T^{hg}/+$; b bei reinen $T^{hg}/+$.
▨ Fehlen eines oder beider Wirbelbogen; ▩ Wirbelbogenspalten

den für Oligodactylie Mitbelasteten ausdrücken. Die gewerteten Zahlen entsprechen etwa der Erwartung von 33% bis zum 1. Kreuzbeinwirbel. Von da an aber tritt eine klare Zunahme der Wirbelkörperspalten dieser Tiere hervor.

Die oligodactylen o/o $T^{hg}/+$ -Tiere sind also auch bei den Wirbelkörperspaltsbildungen am Kreuzbein stärker betroffen als die $T^{hg}/+$ -Tiere.

Eine entsprechende Untersuchung wurde für die Wirbelbogenspalten durchgeführt (Abb. 5a und 5b). In Abb. 5a (oligodactyle $T^{hg}/+$ -Tiere) ist die Basis

beider Kurven sowohl für Wirbelbogenspalten als auch für Wirbelbogenaplasien in der Brustwirbelsäule und ab Kreuzbeinmitte gegenüber den analogen Kurven der Abb. 5b breiter. Aber auch der Umriß beider Kurven der Abb. 5a ist im Gipfel L 2—S 3 breiter als der der Abb. 5b. Allerdings unterscheiden sich auch die Maximalwerte für das Wirbelbogenfehlen; bei den o/o $T^{hg}/+$ liegt dieser caudaler (S2) als bei den reinen $T^{hg}/+$ (L5). Im ganzen ist die von den Wirbelbogenspalten bei Oligodactylen eingenommene Fläche größer, als es der Hälfte der Abb. 5b entsprechen würde. In Zahlen ausgedrückt werden die Verhältnisse klarer.

Tabelle 10. Signifikanzprüfung der Werte für Wirbelbogenspalten bei Oligodactylie-Mitbelastung

Wirbelbogenspalten		$T^{hg}/+$ o/o	$T^{hg}/+$	Gesamt
Gefunden	(b)	274 (42,8 %)	365 (57,2 %)	639 (100 %)
Theoretisch	(e)	211 (33 %)	428 (67 %)	639 (100 %)
$b - e$		+ 63	- 63	

$$\chi^2 = \frac{(b-e)^2}{e} \quad n = 1;$$

$$\chi^2 = 28,07 \quad P = 0,01;$$

$$\chi^2_{\text{theor}} = 6,635;$$

Also besteht ein signifikanter Unterschied mit einer statistischen Sicherung von mehr als 99 % zwischen den gefundenen und erwarteten Zahlen für Wirbelbogenspalten bei o/o $T^{hg}/+$.

In der Zusammenstellung der Tabelle 11 werden die absoluten Zahlen der Abb. 5a in Prozente auf die Summe beider gewählten Werte verwandelt. Dies geschieht, um das stärkere Betroffensein der o/o $T^{hg}/+$ -Tiere zu untersuchen.

Sagte die Homogenitätsprüfung der Summe aller Wirbelbogenspalten (Tabelle 10) bereits über eine signifikante Differenz im allgemeinen aus, so gibt diese Tabelle 11 Aufschluß über die Verteilung der verschiedenen Spalten des Neuralbogens auf die einzelnen Segmente. Nach der Berechnung besteht ein signifikanter Unterschied bei einer Sicherung von mehr als 99 % zwischen den gefundenen und den Erwartungswerten aller Wirbelbogenspalten eines jeden Segmentes bei o/o $T^{hg}/+$ -Tieren.

Wie schon bei der graphischen Darstellung in den Abb. 5a und 5b, so ist nun auch in Zahlen die Gesamtergebnisquote in fast allen Segmenten höher als 33 %. Dies stimmt gut mit der Berechnung auf Grund der Zahlen von Tabelle 10 überein. Bei den reinen Wirbelbogenspalten ist das Bild ebenso. Die Anfangs- und Endstrecke sind stärker betroffen, doch ist wegen der kleineren Zahlen Zurückhaltung vor sicheren Schlüssen geboten. Auffallenderweise liegen die Segmente L4—S1 bezüglich der Wirbelbogenspalte etwas unter der Erwartung von 33 % (s. Tabelle 11).

Unsere Untersuchungen über die Mitbelastung durch Oligodactylie ergaben also, daß laut Tabelle 4 sich die einzelnen durchschnittlichen Wurfgrößen nicht wesentlich voneinander unterscheiden.

Eine Untersuchung der Spaltzahl brachte nur im Rahmen des Zufälligen liegende abweichende Ergebnisse für die Häufigkeit der Kurzschwänze.

Tabelle 11. Signifikanzprüfung des Unterschiedes zwischen den gefundenen (Zeile 4) und den theoretischen Zahlen (Zeile 5) in Prozenten nach der Formel von BRANDT-SNEDECOR

Zelle	Brustwirbelsäule										Lendenwirbelsäule						Kreuzbein				Schwanzwirbelsäule			
	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.		1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	3.	4.	1.	2.	3.	4.
1										100	50	50	57	31	23	28	32	58	47	60	66	37	60	0
2																								
3	100	40	63	54	47	38	38	37	31		37	39	38	42	55	55	39	43	52	43	57	75	100	0
4	100	40	63	54	47	38	38	37	33		38	40	41	39	40	46	36	49	50	48	59	54	66	0
5	33	33	33	33	33	33	33	33	33		33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
6											71	73	74	72	73	79	69	82	83	81	92	87	99	33

ad 1. Ordnungszahlen der Wirbel in den bezeichneten Wirbelsäulenbereichen. ad 2. Aplasie des Wirbelbogens in Prozent bei oligodactylen $T^{hg}/+$. ad 3. Wirbelbogenspalt in Prozent bei oligodactylen $T^{hg}/+$. ad 4. Aplasien und Wirbelbogenspalt in Prozent bei oligodactylen $T^{hg}/+$ ($b_1 - b_{21}$). ad 5. Erwartungswerte für Zeile 4 ($c_1 - c_{21}$). ad 6. Summe von Zeilen 4 und 5 ($T_1 - T_{21}$).

$$T = T_1 \rightarrow T_m \quad T_b = b_1 \cdot b_m \quad T_c = c_1 \rightarrow c_m$$

$$\chi^2 = \frac{T^2}{T_b \cdot T_c} \cdot \left[\left(\frac{c_1^2}{T_1} + \frac{c_2^2}{T_2} + \dots + \frac{c_m^2}{T_m} \right) - \frac{T_c^2}{T} \right]$$

$$\chi^2 = 13,41$$

$$n = 2; \quad P = 0,01; \quad \chi^2_{\text{theor}} = 9,21$$

Die Oligodactylie-Mutante hat also keinen Einfluß auf die Wirkung des T^{hg} -Faktors in quantitativer Hinsicht, d. h. in der Anzahl der pathologischen Tiere, in ihrem Verhältnis zu den Normalen und in der Wurfgröße.

Dagegen bestehen auffallende Korrelationen bezüglich der qualitativen Ausprägung der Mißbildungsmorphe im Sinne einer Zunahme des Schweregrades bei Oligodactylie-Mitbelastung. Die Penetranz bleibt konstant bei gleichzeitiger Änderung der Expressivität.

An dieser Stelle sei auf die Abb. 2a und 2b sowie 3, welche eine relative Vermehrung der pathologischen und fehlenden Wirbel, die zudem noch in der Tabelle 8 statistisch gesichert wird, hingewiesen.

Aufgeteilt in Wirbelkörperspaltbildungen (Abb. 4a und 4b mit Tabelle 9) und Wirbelbogenspaltbildungen (Abb. 5a und 5b mit Tabelle 10 und 11) sind ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Tiergruppen festzustellen.

Peristatische Einflüsse spielen bei den verglichenen Genotypen kaum eine Rolle. Die primäre Genwirkung ist gegenwärtig noch nicht erforscht, man kann also über den direkten Beziehungsmechanismus noch nichts aussagen, doch werden die beiden agierenden Gene sich in einem bestimmten frühen Stadium an einem gleichen Erfolgsystem in ihrer Wirkung treffen und bestärken.

Es ist in der Säugetiergenetik schon oft beobachtet worden, daß das genotypische Milieu von Bedeutung für die Ausprägungsschwankung des Phänotyps ist (STEINIGER 1938, GRÜNEBERG 1952, 1954; GLUECKSSOHN-WAELSCH 1953; DUNN and GLUECKSSOHN-SCHOENHEIMER 1945).

Ein schönes Beispiel hierfür ist die kumulative Wirkung der Gene *Sd* und *T*, welche sich in ihrem Effekt summierend auf die Schwanzverkürzung auswirken.

Weiter führt uns GREEN (1936) ein anderes Beispiel der Wirkung des genotypischen Milieus elegant vor Augen. Es wurden *T*/+ -Tiere mit „little dilute Brown non-agouti“ und mit der chinesischen „mus bacterianus“ gekreuzt, und als Resultat erschien eine deutliche Schwanzverlängerung. DUNN (1942) (zit. bei GRÜNEBERG 1958) zeigte gleichfalls, daß bei Einkreuzung von *T*/+ in den Bagg albino-Stamm die Manifestation des *T*-Gens reduziert wird, d. h., daß die Schwänze länger werden. Bei Einkreuzung von *T*/+ in den *Sd*-Stamm erfolgt wie in unserem Falle bei den oligodactylen *T^{hg}*/+ -Tieren ein additiver Effekt im Sinne einer Zunahme der Schwanzreduktion.

Unser Material ergibt einen weiteren Beweis für die Bedeutung des genotypischen Milieus hinsichtlich des Phänotyps.

Der „Dreher“-Stamm zeigt keine merklichen Beeinflussungen der Wirkung des *T^{hg}*-Faktors.

VI. Begründung der Zuordnung der neuen Kurzschwanzmutante zum *T*-locus

Es wird notwendig, die vorweggenommene Zuordnung unserer neuen Kurzschwanzmutante zum *T*-Ort zu begründen.

Zunächst schalten alle rezessiven Schwanzmutationen aus, da unsere *T^{hg}*-Mutante sich bei den genetischen Untersuchungen als dominant erwies. Auch ist kein Anhalt für eine Geschlechtsgebundenheit gefunden worden, so daß als Parallele die „Bent-tail“-Mutation ebenfalls ausgeschlossen werden kann.

Die Ergebnisse reziproker Kreuzung für pathologische Weibchen und Männchen entsprechen sich bei Berücksichtigung eines physiologischen Überschusses an Männchen gut (Tabelle 1 und 2).

Die phänisch unseren Mäusen sehr ähnlichen *Danforth's short-tail*-Tiere sterben homozygot im Gegensatz zu unseren embryonal letalen *T^{hg}/T^{hg}*-Homozygoten erst 24 Std nach der Geburt ab. Die Gene für „*Sd*“ und „*T*“ sind keine Allele, sie sind in verschiedenen Chromosomen gelegen (DUNN 1949).

Die Mutanten „*Loop-tail*“ und „*Spotch-tail*“ scheiden wegen der Ausbildung von Craniorhachischis totalis, Umbilicalhernien und Schleifenschwanz aus der engeren Wahl. Das gleiche gilt für die „*Fused*“-Mäuse, denn bedingte Lebensfähigkeit der Homozygoten, Taubheit und Chorea unterscheiden sie deutlich trotz vieler Gemeinsamkeiten.

Unsere Werte der Tabelle 2 ergeben auch noch einen genetischen Unterschied, da unsere Kurzschwänze nicht den mütterlichen Einfluß (maternal effect) wie die *Fused*-Mutante bei reziproken Kreuzungen aufweisen.

Auch KOBOZIEFF (1935) konnte in Analogie zu unseren Ergebnissen in reziproken Kreuzungsversuchen von *T*-Mäusen eine weitgehende Unabhängigkeit der Anzahl der pathologischen Kurzschwanzmäuse vom Geschlecht des elterlichen Konduktors an etwas kleineren Zahlen feststellen. So ergab *T*-Belastung des

Vaters 43,2% $T/+$ und T -Belastung der Mutter 42,4% $T/+$ bei insgesamt 200 $T/+$ (43 %) von 465 Nachkommen.

Es bleibt also übrig, eine Zuordnung zu den T -Allelen zu versuchen. Die Erforschung der Mutation am T -locus beginnt mit der Entdeckung des *short-tail*-Gens „ T^s “ (Brachyury) durch DOBROWOLSKAJA-ZAWADSKAJA (1927) (s. auch STEINIGER 1938, DUNN 1949, GRÜNEBERG 1952). Folgende Daten wurden bisher erarbeitet:

Tabelle 12. Kreuzungsergebnisse des T -Stammes

Autor	F_1 Jahr	Ein Elternteil belastet			Beide Eltern belastet		
		$T/+$	$+/+$	gesamt	$T/+$	$+/+$	gesamt
LANG	1912	251 (48,5 %)	268	519	197 (55,5 %)	158	355
DUBOSCQ	1922	8 (33,3 %)	16	24	—	—	—
DOBROWOLSKAJA-ZAWADSKAJA und KOBOZIEFF	1930	559 (46,4 %)	667	1226	1363 (64,8 %)	738	2101
CLARK	1934	620 (50,2 %)	618	1238	—	—	—
KOBOZIEFF (reziproke Kreuzun- gen)	1935	200 (43 %)	265	465	—	—	—
KOBOZIEFF	1935	375 (46,6 %)	431	806	1151 (65,3 %)	612	1763
KOBOZIEFF und POMRIASKINSKI (zit. bei STEINIGER 1938)	1938	—	—	—	949 (61,9 %)	583	1532
DUNN (zit. bei GRÜNEBERG 1952)	1940	—	—	—	1225 (71 %)	597	1722
LYON	1959	113 (52,3 %)	103	216	—	—	—

Tabelle 13. Wurfgrößen des T -Stammes

Anpaarung		$T/+ \times T/+$		$T/+ \times +/+$	
Autor		Wurfgröße	Wurfzahl	Wurfgröße	Wurfzahl
LANG	1912	4,44 (71 %)	80	6,26 (100 %)	83
DUBOSCQ	1922	—	—	3,0	8
DOBROWOLSKAJA-ZAWADSKAJA und KOBOZIEFF	1930	3,93 (79,3 %)	534	4,96 (100 %)	247
KOBOZIEFF	1935	4,14 (81,6 %)	424	5,08 (100 %)	157

Der Idealwert 50 % für die Belastung durch ein Elternteil wird in Tabelle 12 einmal fast erreicht (CLARK 1934), sonst liegen die Häufigkeiten für Heterozygoten um den Erwartungswert nahe gruppiert. Die von den einzelnen Autoren gefundenen Zahlen für die Heterozygoten bei Belastung durch beide Eltern liegen alle um den theoretischen Wert von 66 % gestreut. Die Spaltzahlen der Tabelle 12, Spalte „beide Eltern belastet“, weisen auf ein embryonales Absterben von T/T -Homozygoten, die theoretisch den Wert von 25 % erreichen müssen, hin. Dies wurde auch durch Sektionen bewiesen (Tabelle 7).

Die Hypothese dieser embryonalen Mortalität wird außerdem durch die verkleinerte Wurfgröße gestützt.

Im Schrifttum werden bei Kreuzungen mit dem T -Gen nachstehende Wurfgrößen vorgefunden (in Klammer stehen die Prozentzahlen) (Tabelle 13).

Diese passen etwa bei Berücksichtigung der oben angeführten Gründe für Wurfgrößenabweichungen zu den eigenen Ergebnissen.

Später wurden die abgestorbenen T/T -Homozygoten dann auch bei Sektionen um den 10. Tag gefunden und beschrieben (CHESLEY 1935, KOBOZIEFF 1935). Der Tod der T/T tritt streng phasenspezifisch am 10.—11. Tage ein (HADORN 1955; GLUECKSSOHN-WAELSCH 1953; DUNN und GLUECKSSOHN-WAELSCH 1953). Dies geschieht wohl infolge des Fehlens einer jeglichen umbilikalen Verbindung mit der Mutter zum Zeitpunkt der notwendigen Übernahme der Gesamtversorgung des Embryos über die Plazenta, da eine Aplasie des unteren Körperendes vorliegt (GLUECKSSOHN-WAELSCH 1953, HADORN 1955; GRÜNEBERG 1958). Wenn vorhin die Mutationen am T -locus als besonders interessant angesehen worden sind, so beruht dies auf dem Umstand, daß der Gen-Ort des IX. Chromosoms der Maus, der für diese Schwanzabnormitäten verantwortlich ist, sich durch eine überraschend hohe Instabilität auszeichnet.

Das Gen „ T^c “ bei der Maus wird von DUNN (1956) als komplexer Locus bezeichnet. Ihm sind zahlreiche rezessive Allele, die Allele der t -Serie, zugeordnet, welche zur Zeit von t^0 bis t^{24} (*Mouse new letters* No 19) im Index durchnumeriert werden. Diese t -Allele sind als neue Mutationen in Laborstämmen, oder in Wildstämmen als t^w -Allele, gefunden worden. Einige der t -Mutationen erwiesen sich als Rekombinationen in einer Region, die dem T -Locus benachbart ist. Man faßt daher den T -Locus nicht als ein Gen im klassischen Sinn, sondern als eine längere, offenbar anormale Chromosomenstrecke auf. Da bisher bei keinem Säugetier ein ähnlicher Fall mit Pseudoallelie bekannt ist, verdient jede neu aufgefundene Mutation am T -Locus besonderes Interesse, zumal LYON (1959) eine neue T -Mutation „ T^{hg} “ fand. Diese unterscheidet sich von dem bisher bekannten T -Allel dadurch, daß die Homozygoten (T^{hg}/T^{hg}) früher absterben als die T/T -Embryonen. Ob unsere Mutation T^{hg} in jeder Beziehung mit T übereinstimmt, läßt sich noch nicht sagen. Gewisse Unstimmigkeiten bestehen unter anderem auch auf Grund der Sektionsergebnisse der Tabelle 7. CARTER und PHILLIPS beschrieben 1950 einen homozygot letalen dominanten Kurzschwanzstamm, der wahrscheinlich eine Wiederkehr des T -Stammes gewesen sein mag (GRÜNEBERG 1952; DUNN und GLUECKSSOHN-WAELSCH 1953).

Von unseren Befunden am bearbeiteten Kurzschwanzstamm entsprechen also sowohl die Spaltzahlen, die den Dominanzbeweis erhärten, als auch die Wurfgrößenherabsetzung infolge der Letalität von Homozygoten, wie die Sektionsergebnisse, der Typus der absterbenden Embryonen und die Mißbildungsskala den zahlreichen Angaben aus dem Schrifttum, so daß wir unsere Mutanten mit Recht als Parallelmutation oder als ein dem T -Ort zuzuordnendes Gen bezeichnen können.

Der endgültige Beweis wäre natürlich nur durch Kreuzung mit dem Original- T -Stamm zu führen, wie auch nur auf diese Weise gegebene Differenzen aufzudecken wären. Leider stand und steht uns dieser Stamm nicht zur Verfügung.

Auch der Phänotyp der bisher beschriebenen $T/+$ -Mäuse ist unseren $T^{hg}/+$ -Heterozygoten gleichartig. Die Schwanzlänge der $T^{hg}/+$ -Tiere ist sehr variabel. Man findet Ankylosen, Spaltbildungen und Aplasien am Körper und Bogen und das „urorectocaudale Syndrom“ (DUNN und GLUECKSSOHN-SCHOENHEIMER 1947) neben vielen anderen Mißbildungen.

Vielleicht ist das Vorkommen von Anuren in unserem Material durch die große Schwankungsbreite der Expressivität des T^{hg} -Faktors bedingt. Die andere Möglichkeit, nämlich das Wirken eines allelomorphen rezessiven t -Faktors, kann vorerst nur erwähnt werden. Die entsprechend durchzuführenden Anpaarungsanalysen bleiben künftiger Bearbeitung vorbehalten.

Zusammenfassung

1. Die Ergebnisse der genetischen Bearbeitung eines spontan entstandenen Kurzschwanzstammes (T^{hg}) bei der Hausmaus werden dargelegt.
2. Bei den T^{hg} -Mäusen wurde ein dominanter Erbgang mit homozygot letaler Wirkung gefunden.
3. Die Heterozygoten der neuen Mutation sind phänisch den Mäusen aus anderen Mutanten am T -locus sehr ähnlich.
4. Eine Untersuchung der Spaltzahlen ergibt klare Übereinstimmung der gefundenen mit den erwarteten Werten. Das erwartete Verhältnis der pathologischen zu den normalen Tieren beträgt 2:1 bei doppelter parentaler Belastung, denn die Homozygoten treten infolge ihres Absterbens um den 10. Tag bei der Geburt nicht mehr in Erscheinung.
5. Ein Anhalt für geschlechtsgebundene Vererbung besteht nicht. Reziproke Kreuzungen ergaben keine Abhängigkeit vom Geschlecht der belasteten Eltern.
6. Die Wurfgröße ist deutlich reduziert, jedoch wird die erwartete Zahl aus noch ungeklärten Ursachen unterschritten. Die Homozygoten T^{hg}/T^{hg} fehlen; sie werden durch präpartale Sektionen nachgewiesen.
7. Es erfolgt eine deutliche statistisch gesicherte Beeinflussung der Expressivität durch das Oligodactylie-Gen; dagegen bleibt die Penetranz konstant. Das Dreher-Gen und der Hydropsgenotyp zeigen keine merkliche Einwirkung. Die Rolle des genotypischen Milieus wird erörtert.
8. Die Identifizierung der neuen Mutante T^{hg} als ein T -Gen wird begründet und die Abgrenzung zu den bekannten Mutationen mit ähnlichem Erscheinungsbild vorgenommen.

Literatur

- CARTER, T. C., and R. J. S. PHILIPS: Three recurrences of mutants in the house mouse. *J. Hered.* **41**, 252f. (1950).
- CHESLEY, P.: Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *J. exp. Zool.* **70**, 429—459 (1935).
- CLARK, F. H.: Inheritance and linkage relations of a new recessive spotting in the house mouse. *Genetics* **19**, 365—393 (1934).
- DOBROWOLSKAJA-ZAWADSKAJA, O.: Sur la mortification spontanée de la queue nouveaunée et sur l'existence d'un caractère (facteur) héréditaire „non viable“. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **97**, 1585—1587 (1927).
- DOBROWOLSKAJA-ZAWADSKAJA, O., et N. KOBOZIEFF: Sur le facteur léthal accompagnant l'anourie et la brachyurie chez la souris. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **191**, 352 (1930).
- DUBOSCQ, O.: Une lignée des souris anouris et ectroméles. *C. R. Ass. franç. Avanc. Sci. Montpellier* **46**, 399—402 Ref. (1922).

- DUNN, L. C.: Some relations between mutations and abnormal development. Departm. Zool. Columbia Univ. 1949.
- DUNN, L. C.: Analysis of a complex gene in the house mouse. Cold Spr. Harb. Symp. **21**, 187—195 (1956).
- DUNN, L. C., and S. GLUECKSSOHN-SCHOENHEIMER: Sirens, aprosopi and intestinal abnormalities in the house mouse. Anat. Rec. **92**, 102—213 (1945).
- DUNN, L. C., and S. GLUECKSSOHN-SCHOENHEIMER: A new complex of hereditary abnormalities in the house mouse. J. exp. Zool. **104**, 25—51 (1947).
- DUNN, L. C., and S. GLUECKSSOHN-WAELSCH: Genetic analysis of seven newly discovered mutant alleles at locus T in the house mouse. Genetics **38**, 261—271 (1953).
- DUNN, L. C., and S. GLUECKSSOHN-WAELSCH: The failure of a t-allele (t^3) to suppress crossing over in the mouse. Genetics **38**, 512—517 (1953).
- FALCONER, D. S., u. U. SIERTS-ROTH: Dreher, ein neues Gen der Tanzmausgruppe bei der Hausmaus. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **84**, 71—73 (1951).
- FISCHER, H.: Morphologische und mikroskopisch-anatomische Untersuchungen am Innenohr eines Stammes spontanmutierter Hausmäuse (Dreher). Z. mikr.-anat. Forsch. **62**, 348 bis 406 (1956).
- FISCHER, H.: Die Embryogenese der Innenohrmißbildungen bei dem spontanmutierten Dreherstamm der Hausmaus. Z. mikr.-anat. Forsch. **64**, 476—497 (1958).
- GLUECKSSOHN-WAELSCH, S.: Lethal factors in development. Quart. Rev. Biol., USA **28**, 2, 115—135 (1953).
- GREEN, E. L.: Multiple lethal genes in the mouse. J. Hered. **27**, 181f. (1936).
- GRÜNEBERG, H.: The genetics of the mouse, 2nd edit. The Hague: Martinus Nijhoff 1952.
- GRÜNEBERG, H.: XII. The development of undulated. Genetics **52**, 441—455 (1954).
- GRÜNEBERG, H.: XXIII. The development of brachyury and anury. J. Embryol. exp. Morph. **6**, 424—434 (1958).
- HADORN, E.: Letalfaktoren. Stuttgart: Georg Thieme 1955.
- HERTWIG, P.: Sechs neue Mutationen bei der Hausmaus in ihrer Bedeutung für allgemeine Vererbungsfragen. Z. menschl. Vererb.- u. Konstit.-Lehre **26**, 1 (1942).
- HERTWIG, P.: Neue Mutationen und Kopplungsgruppen bei der Hausmaus. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **80**, 220—246 (1942).
- HERTWIG, P.: Der Hydrops-Stamm. Züchter **25**, 194—198 (1955).
- KOZOZIEFF, N.: Recherches morphologiques et génétiques sur l'anourie chez la souris. Bull. biol. France et Belg. **69**, 265—404 (1935). Ref.
- KUMINEK, K.: Die Morphologie der unteren Wirbelsäule bei einer spontanen Kurzschwanzmutation der Hausmaus. Biol. Zbl. **78**, 719—758 (1959).
- LANG, A.: Vererbungswissenschaftliche Miscellen. VII. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **8**, 211—283 (1912).
- LYON, M. F.: A new dominant T-allele in the house mouse. J. Hered. **50**, No 3 (1959).

Mouse new letters No 19.

- STEINIGER, G.: Die Genetik und Phylogenese der Wirbelsäulenvarietäten und der Schwanzreduktion. Zschr. menschl. Vererb.- u. Konstit.-Lehre **22**, 584—659 (1938).
- WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik, 3. Aufl. Jena: Gustav Fischer 1958.

Dr. KONSTANTIN KUMINEK, Biologisches Institut der Martin Luther-Universität,
Halle-Wittenberg

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

ÜBER DIE ABHÄNGIGKEIT DER RATE STRAHLENINDUZIERTER
TRANSLOKATIONEN UND REZESSIV GESCHLECHTSGEBUNDENER
LETALFAKTOREN VOM STADIUM DER SPERMATOGENESE
BEI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

H. TRAUT

(Eingegangen am 29. März 1960)

Untersuchungen über die Abhängigkeit strahleninduzierter Mutationen vom Reifegrad der bestrahlten Keimzellen bei *Drosophila* erscheinen — von den theoretischen Folgerungen abgesehen, die man aus ihnen ziehen kann — schon deshalb erforderlich, weil die Reifegradabhängigkeit einen wesentlichen *methodischen* Faktor bei strahlen genetischen Experimenten darstellt.

Im folgenden sollen unsere Ergebnisse zu diesem Thema mitgeteilt und betrachtet werden. Insbesondere wird versucht, eine bis heute bestehende Unklarheit über die Reifegradabhängigkeit der Rate strahleninduzierter Translokationen zu klären: CATSCH und RADU (1943) weisen im Gegensatz zu anderen Autoren¹ (AUERBACH 1954, CLARK 1954, MULLER 1954, GLASS 1955, SCHACHT 1958, STROMNAES 1959) in unreifen Keimzellen *kein* Sensibilitätsmaximum nach, obwohl ihren Untersuchungen das vergleichsweise größte Zahlenmaterial zugrunde liegt. Hierauf haben GLASS (1955, 1956) und FRITZ-NIGGLI (1958, 1959) wiederholt hingewiesen.

Methodik

Für unsere Reifegraduntersuchungen verwendeten wir einen „Zweizweckstamm“, der die Erfassung von Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundenen Letalfaktoren aus den Nachkommen der gleichen bestrahlten Väter erlaubt. Bestrahlte $B \text{ ♂♂}$ wurden hierzu mit $y \text{ sc}^{51} \text{ In } 49 \text{ sc}^8; bw; st \text{ ♀♀}$ gekreuzt². Wegen Einzelheiten dieser Technik sei auf OSTER (1958) verwiesen. Brutmuster: A = 1. Tag, B = 2. bis 3. Tag, C = 4. bis 5. Tag, D = 6. bis 8. Tag, E = 9. bis 11. Tag. (Von einer feineren Unterteilung des Brutmusters, etwa wie bei MOSSIGE in eintägige Perioden, wurde abgesehen, da die Untersuchungen nicht nur dem Gesichtspunkt der Reifegradabhängigkeit, sondern — als Kontrollen — einer anderen, hier nicht interessierenden Fragestellung untergeordnet waren. Das Entsprechende gilt für die folgenden 4000 r-Versuche.) Geschlechtsverhältnis $P \text{ ♀♀} : P \text{ ♂♂} = 3:1$. Alter der $P \text{ ♂♂}$: 4 bis 6 Tage. Temperatur: $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Als Futter diene das übliche Medium aus Maismehl, Sirup, Agar-Agar und Hefe. P-Kulturgläser etwa 50 cm^3 Futter enthaltend. Es wurden nur Translokationen zwischen dem 2. und 3. Chromosom ausgewertet; auf die Erfassung von Y-Translokationen wurde verzichtet aus Gründen, die MULLER (1954) anführt. Bestrahlungsbedingungen: 3000 r, 20 r/min, 150 kV, 10 mA, HWS = 1,3 mm Cu + 1,0 mm Al. (Die niedrige Dosisrate aus einem hier unwesentlichen Grund.)

Bei der Nachprüfung der Ergebnisse von CATSCH und RADU dienten wie dort als rezessive markers des 2. bzw. 3. Chromosoms *cn* und *ss*. Um jedoch auch Translokationen mit dem X-Chromosom erfassen zu können, wurden $P \text{ ♀♀}$ mit \widehat{XX} verwendet. Geschlechtsverhältnis

¹ Zur besseren Vergleichbarkeit werden nur an *Drosophila melanogaster* bei Röntgenbestrahlung in Luft mit Hilfe der Brutmustertechnik durchgeführte Untersuchungen zitiert.

² Dieser von Herrn Dr. I. OSTER (Philadelphia) konstruierte Stamm wurde uns von Frau Dr. CH. AUERBACH (Edinburgh) zur Verfügung gestellt. Beiden sei hier bestens gedankt.

P ♀♀: P ♂♂ = 3:1 bzw. 1:1. Alter der P ♂♂ (Berlin wild) durchschnittlich 5 Tage. Temperatur $25 \pm 1^\circ \text{C}$. Brutmuster: A = 1. Tag, B = 2. bis 4. Tag, C = 5. bis 8. Tag. Bestrahlungsbedingungen: 4000 r, meist etwa 500 r/min, 150 kV, 20 mA, HWS = 6 mm Al. Mehrere kleinere Versuche wurden hier, nachdem die Prüfung auf Heterogenität in den einzelnen Bruten negativ ausgefallen war, zusammengefaßt.

Ergebnisse und Diskussion

Ein Vergleich mit dem bisher von einer Reihe anderer Autoren erarbeiteten Bild läßt eine Diskussion der in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse in den folgenden Punkten wünschenswert erscheinen:

Tabelle 1. Die mit Hilfe eines Zweizweckstammes ermittelten Raten von II—III-Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundenen Letalfaktoren in Abhängigkeit vom Reifegrad

Im Zähler: Zahl der gefundenen Translokationen bzw. Letalen; im Nenner: Zahl der geprüften Gameten. 3000 r. GVP = 3 ♀♀:1 ♂. (Für die außerordentlich geringe Nachkommenszahl in Brut D sind verschiedene Ursachen denkbar: Dominant—Letale, Spermienmangel, Mitoseverzögerung.)

Brutmuster	II—III- Translokationen	Letalfaktoren	Statistische Prüfung der Unterschiede (χ^2 -Methode)	
			Translokationen	Letale
A (1. Tag)	7,9% (31/392)	7,7% (38/495)	$P_{A/B} < 0,001$	$P_{A/B} = 0,11$
B (2.— 3. Tag) . .	2,3% (11/483)	5,4% (38/703)	$P_{B/C} < 0,001$	$P_{B/C} = 0,05$
C (4.— 5. Tag) . .	8,2% (23/279)	8,4% (37/441)		
D (6.— 8. Tag) . .	— (0/6)	— (3/9)	$P_{C/E} < 0,01$	$P_{C/E} = 0,01$
E (9.—11. Tag) . .	2,9% (9/310)	4,3% (18/423)		

1. Nach MOSSIGE (1956, 1959, sowie persönl. Mitteilung) ergeben kleine Dosen (etwa bis 2000 r) *kein* Absinken der Empfindlichkeit vom 1. Tag auf den (die) folgenden. Als Erklärung kommen wohl folgende Möglichkeiten in Frage: a) Mit kleiner werdenden Mutationsraten bzw. Dosen bleibt das Empfindlichkeitsverhältnis des 1. und 2. (+ 3.) Tages zwar konstant, doch nimmt die Empfindlichkeitsdifferenz zwangsläufig ab, so daß diese bei kleinen Dosen nur noch an sehr großem Zahlenmaterial nachzuweisen sein wird. b) Das geringe Alter (0—4 Std) der von MOSSIGE bestrahlten ♂♂ verhindert eine Erhöhung der Rate des 1. Tages, da zur Zeit der Bestrahlung zu wenig reife (= relativ sensible) Spermatozoen vorhanden sind. c) Der Effekt ist dosisabhängig, derart, daß er mit kleiner werdender Dosis abnimmt.

2. Die relativ niedrig erscheinende Rate von Brut B (2. bis 3. Tag) könnte mit *recovery* in reifen Spermatozoen erklärt werden, eine Erklärung, wie sie NORDBACK und AUERBACH (1956) dem Ergebnis ihrer Untersuchungen über die Reduktion genetischer Schäden am 2., verglichen mit dem 1., Tag zugrunde legen. Dies setzt voraus, daß nicht alle zur Zeit der Bestrahlung reifen Spermien bereits in den ersten 24 Std (Brut A) verbraucht werden, sondern zum Teil erst in Brut B (2. bis 3. bzw. 4. Tag), um hier — infolge *recovery* — die Rate zu erniedrigen. Andererseits wäre auch folgendes denkbar: Dem sich in Brut B manifestierenden postmeiotischen Sensibilitätsminimum dürften zum Teil *Spermatiden* zugrunde liegen, da nach BATEMAN (1958) bei entsprechender Brutmusteranalyse postmeiotische Stadien nicht länger als 5 Tage nach der Bestrahlung analysiert werden. Nimmt man nun an, daß die in Brut B analysierten Spermatiden relativ unempfindlich sind, so ergäbe sich hieraus ein Hinweis für die Ursache

dieses Minimums. Zur Rechtfertigung dieser Annahme sei auf die Interphasenstruktur typischer Spermatidenkerne (u. a. RIS 1958) hingewiesen, wie sie deren besonders intensivem Stoffwechsel entspricht (ALFERT 1958): Sowohl große Stoffwechselaktivität (falls diese geringen intrazellulären Gehalt an freiem Sauerstoff zur Folge hat), wie Interphasenstruktur (mit diffusen Chromosomen) werden aber zur Interpretierung geringer Empfindlichkeit von Chromosomen gegenüber Strahlenwirkung herangezogen; auch sind verschiedene Gründe für eine relativ hohe Restitutionshäufigkeit von Chromosomenbrüchen in der Interphase denkbar.

3. Das Verhältnis Letalenrate/Translokationsrate ist offensichtlich reifegradabhängig; Betrachtungen hierüber sollen aber nicht vor weiteren Untersuchungen dieser Art erfolgen (vgl. auch AUERBACH 1954 und NORDBACK u. AUERBACH 1956).

Unseren Befunden zur eingangs erwähnten Diskrepanz bei den Translokationsuntersuchungen seien die Werte von CATSCH und RADU vorangestellt.

Vergleicht man die Tabellen 1 und 2, so erkennt man, daß das gegen Ende der Brut B₁ zu erwartende Sensibilitätsmaximum fehlt. Als Erklärung sind 2 Möglichkeiten denkbar: Die für B₁ ermittelte Rate kann erstens das Ergebnis der „Kompensation“ einer niedrigen Rate am Anfang (vgl. Tabelle 1, Brut B) und der sehr hohen Rate gegen Ende dieser Brut sein (eigentliches Sensibilitätsmaximum, vgl. Tabelle 1, Brut C). Zweitens könnte das Geschlechtsverhältnis ♀:♂ der Eltern (fortan mit GVP abgekürzt) von Einfluß sein, indem eine zu niedrige Zahl von P ♀♀ pro P ♂♂ den völligen Verbrauch der in der betreffenden Brut befruchtungsfähigen Spermien verhindert, so daß ein Teil davon erst in der nächsten Brut abgesetzt wird. Dadurch würden aber Unterschiede der aufeinanderfolgenden Raten verwischt. Beide Möglichkeiten sollen im folgenden geprüft werden.

Zunächst wird untersucht, ob die erste der beiden Möglichkeiten *allein* zur Erklärung genügt. Hierzu wurde die große Brut B₁ zwar in zwei kleinere (B₂ + C₂¹) zerlegt, jedoch ein GVP zugrunde gelegt, das dem von CATSCH und RADU verwendeten entspricht: 1:1. (Wahrscheinlich betrug das damalige GVP sogar nur 1 ♀ pro 3 ♂♂, CATSCH mündl. Mitteilung.)

Wie Tabelle 3 zeigt, tritt zwar zwischen B₂ und C₂ ein Unterschied in der erwarteten Richtung auf, jedoch schwach und statistisch ungesichert. Doch erhält man, wie zu fordern, durch „Zusammenlegen“ von B₂ und C₂ eine II—III-Translokationsrate (56/888 = 6,3%), die dem von CATSCH und RADU für Brut B₁ ermittelten Wert (6,2%) gut entspricht.

Als nächstes soll daher untersucht werden, ob sich bei zusätzlicher Berücksichtigung der anderen Möglichkeit (GVP) das in Brut C zu vermutende Sensibilitätsmaximum deutlicher manifestiert.

¹ Die Einbeziehung des 8. Tages in Brut C₂ ist wegen der hohen ♂-Sterilität zu dieser Zeit ohne Einfluß.

Tabelle 2. Die von CATSCH und RADU (1943) festgestellte Abhängigkeit der Translokationsrate vom Reifegrad

4000 r, 70 kV, 0,5 mm Al-Filter, 66,7 r/min. (Die Indizes an den Brutbezeichnungen aus Vergleichsgründen.) GVP ≤ 1 ♀: 1 ♂.

Brutmuster	II—III-Translokationen
A ₁ (1. Tag) . . .	11,96% (306/2559)
B ₁ (2.— 7. Tag) .	6,21% (92/1483)
C ₁ (8.—13. Tag) .	6,89% (78/1133)
D ₁ (14.—19. Tag) .	1,37% (21/1532)
E ₁ (20.—25. Tag) .	0,10% (1/1028)
F ₁ (26.—31. Tag) .	— (0/629)

Tabelle 3. Die Translokationsrate in Abhängigkeit vom Reifegrad
Gesamttranslokationen II III, X—II, X—III, X—II—III. 4000 r. GVP = 1 ♀: 1 ♂.

Brutmuster	II III- Translokationen	Gesamt- Translokationen	Statistische Prüfung der Unterschiede (χ^2 -Methode)	
			Translokationen	Gesamt- Translokationen
A ₂ (1. Tag) . . .	9,0% (41/455)	11,9% (54/455)	$P_{A/B} = 0,05$	$P_{A/B} = 0,04$
B ₂ (2.—4. Tag) . .	5,8% (37/634)	8,2% (52/634)	$P_{B/C} = 0,36$	$P_{B/C} = 0,14$
C ₂ (5.—8. Tag) . .	7,5% (19/254)	11,4% (29/254)		

Wie Tabelle 4 zeigt, hat die relativ größere P ♀♀-Zahl tatsächlich eine deutlichere Ausprägung des Sensibilitätsmaximums (C₃) zufolge. Auch hier stimmt die durch „Zusammenlegen“ von B₃ und C₃ errechnete II—III-Translokationsrate (118/1799 6,6%) gut mit dem entsprechenden von CATSCH und RADU gefundenen Wert (6,2%) überein.

Tabelle 4. Wie Tabelle 3, jedoch GVP = 3 ♀♀: 1 ♂

Brutmuster	II—III- Translokationen	Gesamt- Translokationen	Statistische Prüfung der Unterschiede (χ^2 -Methode)	
			Translokationen	Gesamt- Translokationen
A ₃ (1. Tag) . . .	10,1% (79/784)	12,2% (96/784)	$P_{A/B} < 0,001$	$P_{A/B} < 0,001$
B ₃ (2.—4. Tag) . .	5,9% (100/1683)	7,2% (121/1683)	$P_{B/C} < 0,001$	$P_{B,C} < 0,001$
C ₃ (5.—8. Tag) . .	15,5% (18/116)	18,1% (21/116)		

Vergleicht man die Tabellen 3 und 4, so erkennt man den Zusammenhang zwischen GVP, Nachkommenzahl pro Brut und Mutationsrate pro Brut: Je weniger P ♀♀ pro P ♂ (z.B. 1:1), desto mehr bereits in B befruchtungsfähige Spermatozoen werden erst in C verbraucht, desto größer die relative Nachkommenzahl und desto niedriger (wegen der relativ niedrigen B-Rate) die Rate in C. Entsprechend das Umgekehrte gilt bei relativer großer P ♀♀-Zahl (z.B. 3:1).

Somit dürfte der Widerspruch, in dem die Ergebnisse von CATSCH und RADU zu denen anderer Autoren stehen, insofern nur ein scheinbarer sein, als er sich auf verschiedene Versuchsbedingungen (Brutmustereinteilung, GVP) zurückführen läßt.

Zusammenfassung

1. Mittels eines Zweizweckstammes wurde die Abhängigkeit strahleninduzierter Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren vom Reifegrad der bestrahlten Keimzellen bei *Drosophila melanogaster* untersucht und diskutiert.

2. Ein bisher bestehender Widerspruch in der Reifegradabhängigkeit strahleninduzierter Translokationen ließ sich auf Unterschiede in der Versuchsanordnung zurückführen: Neben entsprechender Brutmustereinteilung erwies sich ein P ♀♀-Überschuß im Verhältnis 3:1 als notwendig zur Erfassung des im Bereich unreifer Keimzellen zu erwartenden Sensibilitätsmaximums.

Summary

1. Utilizing a dual-purpose stock of *Drosophila melanogaster* the dependence of radiation induced translocations and recessive sex-linked lethals on the stage of spermatogenesis was investigated and is discussed.

2. A formerly existing discrepancy in the dependence of radiation induced translocations on the stage of maturity of the irradiated germ cells is explained by differences in experimental procedure: Besides an adequate subdivision of the brood pattern an excess of P-females in the ratio of 3:1 was necessary for obtaining maximum sensibility expected in the region of immature germ cells.

Fräulein U. APITZSCH danke ich für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Untersuchungen.

Literatur

- ALFERT, M.: Cytochemische Untersuchungen an basischen Kernproteinen während der Gametenbildung, Befruchtung und Entwicklung. 9. Coll. Ges. physiol. Chemie, 17. bis 19. April 1958, Mosbach (Baden). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.
- AUERBACH, C.: The brood pattern of X-ray-induced rearrangements. Dros. Inform. Serv. **28**, 101 (1954).
- BATEMAN, A. J.: Mutations in irradiated spermatocytes. Dros. Inform. Serv. **32**, 113 (1958).
- CATSCH, A., u. G. RADU: Über die Abhängigkeit der röntgeninduzierten Translokationsrate vom Reifezustand der bestrahlten Gameten bei *Drosophila melanogaster*-♂♂. Naturwissenschaften **31**, 368 (1943).
- CLARK, A. M.: Sensitive periods and apparent fractionation effects in irradiated *Drosophila*. Amer. Naturalist **89**, 179 (1955).
- FRITZ-NIGGLI, H.: Mögliche Ursachen der verschiedenen Strahlenempfindlichkeit des Erbmaterials in Keimzellen unterschiedlichen Alters. Naturwissenschaften **45**, 557 (1958).
- FRITZ-NIGGLI, H.: Strahlenbiologie. Stuttgart: Georg Thieme 1959.
- GLASS, B.: A comparative study of induced mutation in the oocytes and spermatozoa of *Drosophila melanogaster*. I. Translocation and inversions. Genetics **40**, 252 (1955).
- GLASS, B.: Differences in the mutability during different stages of gametogenesis in *Drosophila*. "Mutation", Brookhaven Symp. Biol. **8**, 148 (1956).
- MOSSIGE, J. C.: The relative biological efficiency of 31 MeV betatron X-irradiation and 175 keV X-rays as measured by recessive sex-linked lethals in *Drosophila melanogaster*. Progr. Radiobiol. **137** (1956).
- MOSSIGE, J. C.: Studies on linearity and RBE in *Drosophila* sperm. Second report from Norsk Hydro's Institute for Cancer Res. **18** (1959).
- MULLER, H. J.: The relation of neutron dose to chromosome changes and point mutations in *Drosophila*. I. Translocations. Amer. Naturalist **88**, 437 (1954).
- NORDBACK, K., and C. AUERBACH: Recovery of chromosomes from X-ray damage. Advances in radiobiology, Stockholm 1956, pp. 481—485. Edinburgh u. London: Oliver & Boyd.
- OSTER, I.: Radiosensitivity. Genen en Phaenen **3**, 53 (1958).
- RIS, H.: Die Feinstruktur des Kerns während der Spermiogenese. 9. Coll. Ges. physiol. Chemie, 17.—19. April 1958, Mosbach (Baden). Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer.
- SCHACHT, L. E.: The time of X-ray induction of crossovers and of translocations in *Drosophila melanogaster* males. Genetics **43**, 665 (1958).
- STROMNAES, O.: Stock differences in X-ray mutational sensitivity pattern of *Drosophila melanogaster*. Hereditas (Lund) **45**, 221 (1959).

Dr. H. TRAUT,

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe,
Karlsruhe, Weberstr. 5

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

ZUR FEINSTRUKTUR DER AUGENGRANULA BEI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

IRMGARD ZIEGLER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Mai 1960)

Einleitung

Die Pigmentgranula in den Haupt- und Nebenzellen von *Drosophila*-Augen bestehen aus den „Trägergranula“ und dem aufgelagerten Pigment (Pterine und Ommochrome). Das Trägergranulum, welches in ungefärbtem Zustand auch bei der *white*-Mutante vorhanden ist (ZIEGLER und JAENICKE 1959), konnte in seiner Zusammensetzung analysiert und die Aktivität verschiedener Enzyme nachgewiesen werden.

Eine für das Verständnis sowohl der Pigmentphysiologie als auch der Wirkungsweise der zahlreichen Augenfarbenmutanten wichtige Frage ist, wie der Feinbau eines solchen Pigmentgranulums beschaffen ist und ob sich eine bestimmte Anordnung des Pigmentes auf der „Trägersubstanz“ erkennen läßt.

Material und Methodik

100—200 abgetrennte Köpfe von *Drosophila melanogaster* wurden in 0,5 ml eiskühlem m/10 Phosphatpuffer pH 7,4/Rohrzucker 0,33 M in einem locker sitzenden Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert, zuerst bei $500 \times g$ 4 min, der Überstand dann bei $5000 \times g$ 4 min zentrifugiert. Die abgesetzten Granula wurden $1\frac{1}{2}$ Std mit eiskalter, 1%iger Osmiumsäure (in obigem Puffer-Rohrzuckergemisch) fixiert. Zur Ganzbeobachtung wurden sie nach dem Waschen mit Wasser mit einer feinen Kapillare auf die Trägernetzchen aufgetropft, zur Herstellung von Ultradünnschnitten mit dem Reichert-Ultramikrotom nach SITTE wie üblich über Aceton entwässert und in einem Gemisch von 93 Teilen Methacrylsäurebutylester und 7 Teilen -methylester (+ 0,5% Percadox) bei 45° C eingebettet. Die Präparate (Schnittstärke etwa 500 Å) wurden im Siemens-Übermikroskop 100 e₂ bei 80 KV Strahlspannung untersucht.

Ergebnisse

Die aufgetropften Granula sind rund bis oval; ihr größter Durchmesser schwankt zwischen 0,7—1,4 μ . Es zeigt sich bereits am ungeschnittenen Objekt, daß das Pigmentgranulum nicht ein einheitliches Gebilde darstellt, sondern von vielen wiederum runden bis eiförmigen Untereinheiten aufgebaut ist. Diese „Subgranula“ sind gut in den kleinen Pigmentgranula zu erkennen, wo sie selbst noch sehr klein sind und letztere noch nicht ganz ausfüllen (Abb. 1). Bei den großen Pigmentgranula sind sie meist so dicht gepackt, daß die Untereinheiten nur noch undeutlich durch den Wechsel von dunkleren und helleren Partien erkannt werden können.

Am Schnitt wird deutlich, daß die Untereinheiten (Durchmesser maximal etwa 0,4 μ) von stark osmiophilen Körnchen durchsetzt sind, wobei eine Reihung auf-

tritt (Abb. 2 und 3). Die Reihen haben eine Distanz von 50 Å, die osmiophilen Körnchen mit einem Durchmesser von etwa 30 Å liegen an der Grenze des Auflösungsvermögens.

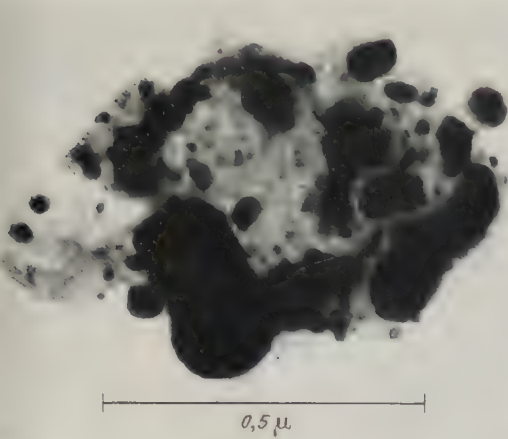


Abb. 1

Abb. 1. Pigmentgranulum von *Drosophila melanogaster* (Wildstamm)

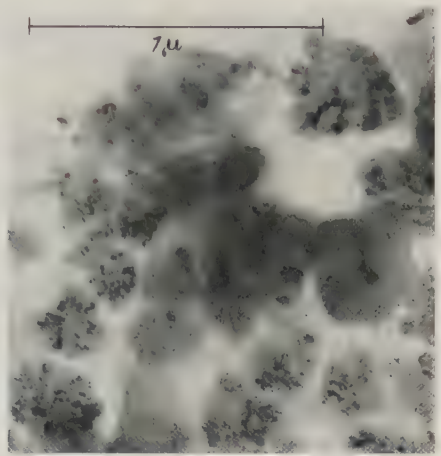


Abb. 2

Abb. 2. Schnitt durch ein Pigmentgranulum von *Drosophila melanogaster* (Wildstamm)

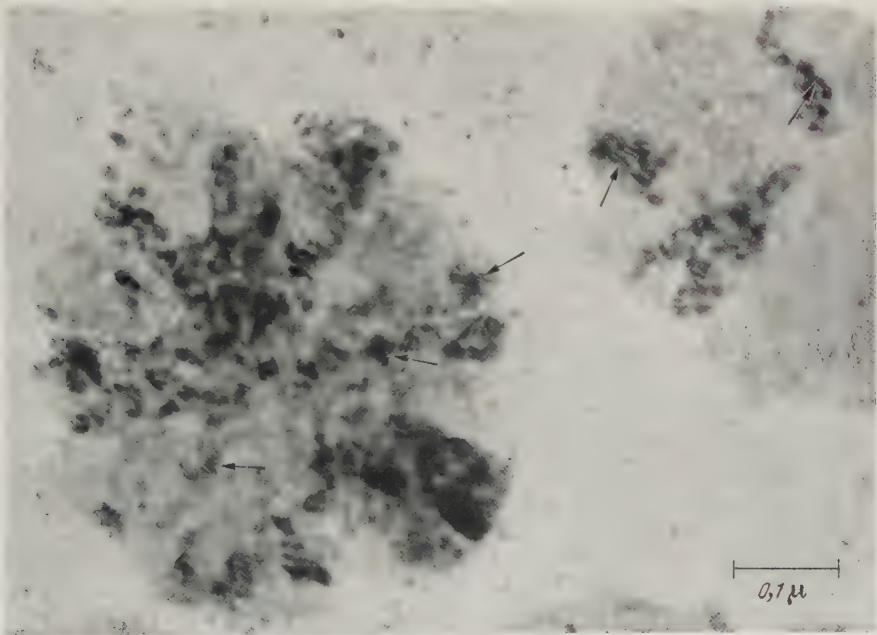


Abb. 3. Schnitt durch eine Untereinheit eines Pigmentgranulums von *Drosophila melanogaster* (Wildstamm). → Reihung der osmiophilen Körnchen

Lichtmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß bei der *white*-Mutante von *Drosophila melanogaster* zwar die Pterine und Ommochrome fehlen, die Trägergranula jedoch erhalten bleiben. Versucht man, diese wie beim Wildstamm

in 0,33 M Rohrzuckerlösung zu isolieren und zu fixieren, so zeigt das Trägergranulum das kontrastschwache Material, wie wir es beim Wildtyp zwischen den „Subgranula“ finden; die „Subgranula“ und die osmiophilen Körnchen fehlen. Jedoch ist das Trägergranulum bei obiger Rohrzuckerkonzentration stets an einer Seite aufgeplatzt und ein kugelförmiger, osmiophiler Körper von $0,5\text{--}0,6\ \mu$ Durchmesser daneben zu finden. Offensichtlich stellt obige Rohrzuckerlösung für die *white*-Granula eine hypotonische Lösung dar. Nimmt man höhere Zucker-

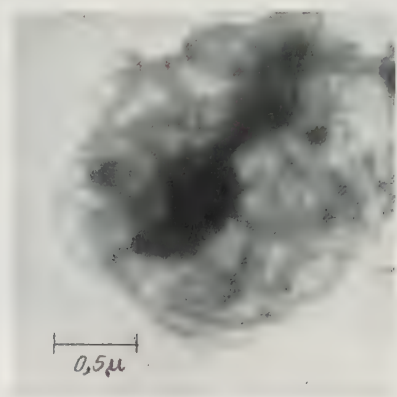


Abb. 4. Trägergranulum von *Drosophila melanogaster* (*white*-Mutante; 0,7 M Rohrzuckerlösung)

konzentrationen (0,5—0,7 M), so findet sich der osmiophile Körper zwar im Zentrum des Trägergranulums (Abb. 4), der Erhaltungszustand der Grundsubstanz ist jedoch sehr schlecht.

Diskussion

Die bisherigen — auch elektronenoptischen — Darstellungen der Pigmentgranula (z.B. YASUZUMI und DEGUCHI 1958, ZEUTZSCHEL 1958) lassen noch keine weitere Auflösung ihrer Struktur erkennen und gaben Anlaß zu der Vermutung, daß der Farbstoff die Granula völlig durchsetzt (ZEUTZSCHEL l. c.). Die von YASUZUMI ebenfalls als homogene, osmiophile Kugeln dargestellten „pigment granules“ der Pigmentzellen entsprechen in ihrer Größe den hier vorliegenden Pigmentgranula, während die viel kleineren „fine dense granules“ (Durchmesser etwa $0,18\ \mu$) der Retinazellen bei den angewandten Zentrifugalkräften nicht gefunden werden konnten. Neben der Tatsache, daß die Pigmentgranula, welche einen Rauminhalt von $0,17\text{--}0,65\ \mu^3$ besitzen, von ebenfalls kugeligen Unterheiten mit einem Rauminhalt in der Größenordnung von $0,01\text{--}0,030\ \mu^3$ aufgebaut werden, ist die Vermutung berechtigt, daß der reihenförmige Niederschlag osmiophiler Körnchen ebenfalls eine gesetzmäßige Anordnung der letzten Unterheiten widerspiegelt. Das Fehlen dieser Körnchen bei *white* weist darauf hin, daß es sich dabei um das osmiumsäurespeichernde Pigment handelt. Weitere Untersuchungen unter Verwendung verschiedenster Fixierungsmittel müßten klären, inwieweit sich diese lineare kugelförmige Anordnung der osmiophilen Pigmentkörnchen mit der linearen Aggregation von kugeligen Makromolekülen (vgl. FREY-WYSSLING 1955) im Cytoplasma vergleichen läßt. Andererseits könnte

durch Auswahl geeigneter Mutanten (z. B. *cinnabar* einerseits und *brown* andererseits) die Frage entschieden werden, ob Pterine und Ommochrome verschiedene und verschiedenartige Granula bzw. Subgranula besetzen.

Die Beobachtung, daß die *white*-Granula einen höheren osmotischen Wert aufweisen als die des Wildtyps und in 0,33 M Rohrzuckerlösung unter Aufplatzen des Granulums stark osmiophiles Material entlassen, legt die Vermutung nahe, daß Vorstufen der Pigmente in osmotisch wirksamer Form darin noch gespeichert sind, während sie beim Wildtyp die hochmolekularen (osmotisch unwirksamen) Pigmentproteide bilden. HADORN und KÜRSTEINER (1955) haben in den Meconien von *white* im Vergleich zum Wildtyp eine etwa 2,5fache Menge an fluoreszierenden Verbindungen (größtenteils einfache Pterine) beobachtet; diese können aber nur einen Teil des nicht zur Pigmentsynthese verwendeten Materials ausmachen. Da die Augen adulter Fliegen keinerlei Fluoreszenzstoffe mehr enthalten (HADORN u. ZIEGLER 1958), wäre es für eine Analyse der Wirkung des *white*-Allels von Interesse, die Natur dieses löslichen osmiophilen Granulainhaltes zu untersuchen.

Zusammenfassung

Elektronenmikroskopische Untersuchung der isolierten Pigmentgranula von *Drosophila melanogaster* zeigt, daß die Granula des Wildstammes aus kugeligen bis ovalen Untereinheiten (maximaler Durchmesser $0,4\mu$) aufgebaut sind. Letztere zeigen eine reihenförmige Anordnung osmiophiler Körnchen, was eine gesetzmäßige Lagerung der Pigmente (Pterine und Ommochrome) vermuten läßt. Die Trägergranula der *white*-Mutante weisen weder Untereinheiten noch osmiophile Granula auf, haben einen wesentlich höheren osmotischen Wert als die Granula des Wildtyps und besitzen im Zentrum eine kugelförmige Aggregation osmiophiler Materials.

Die Arbeit wurde durchgeführt mit apparativer Unterstützung der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“. Herrn Prof. Dr. U. HOFFMANN, Eduard Zintl-Institut für anorganische Chemie der TH Darmstadt, bin ich für die freundliche Erlaubnis zur Benützung des Elektronenmikroskopes zu Dank verpflichtet; Fr. K. HEIDEKLING danke ich für ihre Mitarbeit.

Literatur

- FREY-WYSSLING, A.: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. In: Protoplasmatologia, Bd. II, A 2. Wien: Springer 1955.
- HADORN, E., u. R. KÜRSTEINER: Unterschiede in Exkretstoffen bei verschiedenen Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Arch. Klaus-Stift. Vererb.-Forsch. **30**, 494—498 (1955).
- HADORN, E., u. I. ZIEGLER: Untersuchungen zur Entwicklung, Geschlechtsspezifität und phänotypischen Autonomie der Augen-Pterine verschiedener Genotypen von *Drosophila melanogaster*. Z. Vererb.-Lehre **89**, 221—234.
- YASUZUMI, G., and N. DEGUCHI: Submicroscopic structure of the compound eye as revealed by electron microscopy. J. ultrastruct. Res. **1**, 259—270 (1958).
- ZEUTZSCHEL, B.: Entwicklung und Lage der Augenpigmente bei verschiedenen *Drosophila*-Mutanten. Z. Vererb.-Lehre **89**, 508—520 (1958).
- ZIEGLER, I., u. L. JAENICKE: Zur Wirkungsweise des *white*-Allels bei *Drosophila melanogaster*. Z. Vererb.-Lehre **90**, 53—61 (1959).

Dr. IRMGARD ZIEGLER,
Botanisches Institut der Technischen Hochschule Darmstadt,
Roßdörferstr. 140

Department of Zoology, Columbia University, New York

IS DNA REPLICATION A NECESSARY CONDITION FOR MUTATION?*

By

DAISUKE NAKADA, EUNICE STRELZOFF, RIVKA RUDNER and FRANCIS J. RYAN

With 1 Figure in the Text

(Received June 9, 1960)

Since mutations occur in non-dividing bacteria (RYAN 1959), the question arises whether the replication of genetic material is nonetheless required. With bacteriophage T2 it has been shown that mutations can be induced by 5-bromouracil during the DNA synthesis which occurs in the presence or absence of chloramphenicol (LITMAN and PARDEE 1959, BRENNER and SMITH 1959). It has further been shown in *Escherichia coli* that the frequency of mutants induced by caffeine is proportional to the amount of DNA synthesis that occurs when chloramphenicol is present (GLASS and NOVICK 1959) and that mutations induced by ultraviolet light arise correlated with subsequent DNA synthesis (LIEB 1959). These findings are consistent with the working hypothesis of FREESE (1959) which proposes that some chemical mutagenesis involves the incorporation of abnormal bases followed by pairing errors during subsequent DNA replication. This hypothesis has been tested by the use of populations of *Salmonella typhimurium* whose division has been synchronized by filtration; mutations occur in accordance with DNA replication as the hypothesis predicts (RUDNER 1960).

This *Salmonella* system involves mutation from tryptophane dependence (*try* D-10, here called *try*⁻) to tryptophane independence (*try*⁺) induced by 300 μ g. 2-aminopurine per ml. It has the advantage of a low background of spontaneous *try*⁺ mutants. When *try*⁻ cells are exposed to 20 μ g. of chloramphenicol per ml. in the presence or absence of 20 μ g. of tryptophane per ml., within 2 hours there is a net synthesis of 50 per cent more DNA as measured by the Dische reaction, while RNA determined by the orcinol reaction increases almost 3-fold. Thereafter the amounts of these compounds remain constant for as long as 5 hours. If 2-aminopurine is present at the onset of this synthesis, mutations are induced; on the other hand, if the cultures are provided with 2-aminopurine after synthesis has ceased, no mutations are detectable (Fig. 1). Under these conditions, therefore, the synthesis of nucleic acid is required for the induction of mutation while the synthesis of protein is not.

In the presence of chloramphenicol, although protein synthesis is severely inhibited, a little DNA is replicated and RNA synthesis continues to a somewhat greater extent. When treated cells are plated on minimal medium, this RNA is expected to degrade, as has already been described by NEIDHARDT and GROS (1957) and HOROWITZ, LOMBARD and CHARGAFF (1958), while the DNA and protein should remain almost constant in amount. In our experiments, when

* This work was supported in part by grants from the American Cancer Society, the National Science Foundation and the United States Public Health Service.

cells, treated for two hours with chloramphenicol and 2-aminopurine, were washed and suspended in minimal medium, two hours later the DNA had increased by 3 per cent, the protein had decreased by 16 per cent, while only 66 per cent of the RNA remained. It appears, therefore, that DNA synthesized in the presence of chloramphenicol has biological activity inasmuch as heritable mutations may occur within it during replication. This confirms the previously

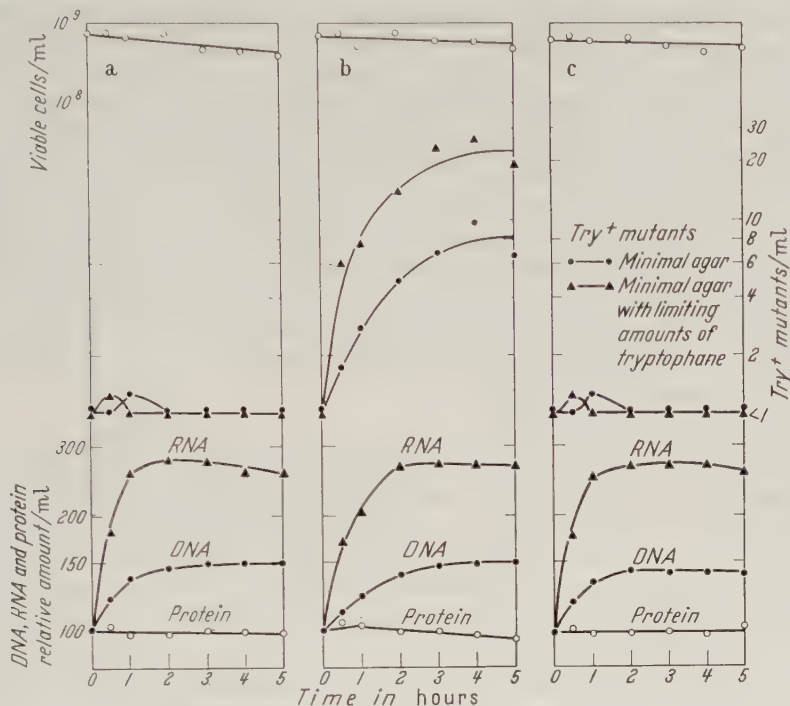


Fig. 1a—c. The effect of 2-aminopurine on the mutation of *Salmonella typhimurium* *try*⁻ to *try*⁺ in the presence of 20 μ g. chloramphenicol per ml. in the absence of tryptophane. In a, no 2-aminopurine was added; in b, 300 μ g. per ml. were provided at 0 time; in c, the same concentration was provided after 2 hours when the synthesis of DNA had ceased. Between 2 and 3 cell divisions were allowed on the minimal agar with limiting amounts of tryptophane where about 30 ml. containing 0.02 μ g. L-tryptophane per ml. were employed

cited work on mutation as well as the conclusions based on the examination of other criteria of biological activity (TOMIZAWA 1958; HERSHEY, BURGI and STREISINGER 1958; THOMAS 1959). The observations are further consistent with the hypothesis that mutation induced by 2-aminopurine requires its incorporation (or that of some other base as a consequence of the presence of 2-aminopurine) while the DNA is replicating.

The fact that only a 50 per cent net increase in DNA was sufficient to allow the occurrence of mutation and the expression of the mutant phenotype, without any further replication of DNA on the minimal plates, warrants an explanation. Two assumptions can account for this. The first presumes a heterogeneity in the bacterial population under study, some of the cells undergoing replication while others do not. The second proposes that the cells are relatively homogeneous and that in each there is a partial replication of the whole genome so that only some

try loci are replicated. The number of *try*⁻ mutants obtained under these conditions, where the DNA increased by only 50 per cent, was slightly less than half of that when a complete replication was allowed to occur in synchronized cultures (RUDNER 1960).

A heritable change in genotype according to FREESE's (1959) model of mutation via incorporation into DNA can only be complete after two subsequent replications. The data do not, however, show so much DNA synthesis. It must be assumed, therefore, that the incorporation of 2-aminopurine (or of some other base as a consequence of its presence) provides the basis for the synthesis of tryptophane without further replication. It must be concluded, as a consequence, that, if there is more than one mutable unit per cell, *try*⁺ is dominant in a heterokaryon, and that the expression of the phenotype does not require a cell division. As a result of the synthesis of tryptophane, cells which have incorporated in the correct site, do, however, undergo division. Whether they will as a consequence give rise to *try*⁺ and *try*⁻ sister cells and form a line, or whether both offspring will be *try*⁺ and begin a clone, depends upon whether an unusual or a normally synthesized base is incorporated and whether the error in base pairing occurs at the time of incorporation or upon subsequent replication. Evidence on this question is presently being collected.

The conclusion that DNA replication is necessary for the mutations observed under the conditions of these experiments does not exclude the possibility that mutations may also be brought about by exchange reactions in the absence of DNA replication. These may occur slowly and be observed only over longer periods of time such as have been employed in studies of mutations in the stationary phase. Populations of *E. coli* maintained in the stationary phase mutate although the density gradient technique of MESELSON and STAHL (1958) shows that the replication of whole molecules of DNA cannot account for it (RYAN, NAKADA and SCHNEIDER 1960). This alternate possibility of mutation by exchange without DNA replication is currently under investigation.

Literature

- BRENNER, S., and J. D. SMITH: Induction of mutations in the DNA of phage T2 synthesized in the presence of chloramphenicol. *Virology* **8**, 124 (1959).
- FREESE, E.: The difference between spontaneous and base-analogue induced mutations of phage T4. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 622 (1959).
- FREESE, E.: The specific mutagenic effect of base analogues on phage T4. *J. mol. Biol.* **1**, 87 (1959).
- GLASS, E. A., and A. NOVICK: Induction of mutation in chloramphenicol-inhibited bacteria. *J. Bact.* **77**, 10 (1959).
- HERSHEY, A. D., E. BURGH and G. STREISINGER: Genetic recombination between phages in the presence of chloramphenicol. *Virology* **6**, 287 (1958).
- HOROWITZ, J., A. LOMBARD and E. CHARGAFF: Aspects of the stability of RNA. *J. biol. Chem.* **233**, 1517 (1958).
- LIEB, M.: DNA synthesis and ultraviolet-induced mutation. *Biochim. Biophys. Acta* **37**, 155 (1959).
- LITMAN, R. M., and A. B. PARDEE: Mutations of bacteriophage T2 induced by bromouracil in the presence of chloramphenicol. *Virology* **8**, 125 (1959).
- MESELSON, M., and F. W. STAHL: The replication of DNA in *E. coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **44**, 671 (1958).

- NEIDHARDT, F. C., and F. GROS: Metabolic instability of the RNA synthesized by *E. coli* in the presence of chloromycetin. *Biochim. biophys. Acta* **25**, 513 (1957).
- RUDNER, R.: In preparation.
- RYAN, F. J.: Bacterial mutation in the stationary phase and the question of cell turnover. *J. gen. Microbiol.* **21**, 530 (1959).
- RYAN, F. J., D. NAKADA and M. SCHNEIDER: In preparation.
- THOMAS, R.: Effects of chloramphenicol on genetic replication of bacteriophage λ . *Virology* **9**, 275 (1959).
- TOMIZAWA, J.: Sensitivity of phage precursor nucleic acid, synthesized in the presence of chloramphenicol, to ultraviolet light. *Virology* **6**, 55 (1958).

Professor Dr. F. RYAN,
Dept. of Zoology, Columbia University in the City of New York,
New York 27, U.S.A.

Istituto di Genetica vegetale dell'Università Catt. del S. Cuore, Piacenza
Istituto di Genetica dell'Università di Milano, Milan, Italy

THE SURFACE OF THE LEAF IN NORMAL AND GLOSSY MAIZE SEEDLINGS

By

A. BIANCHI and G. MARCHESI

With 1 Figure in the Text

(Received June 12, 1960)

Introduction

Water collects in drops on smooth surfaces if the contact angle exceeds 100° . Roughening of the surfaces may increase the contact angle and, consequently, the water repellency if the material has a contact angle on the plane surface of above 90° . Such an effect depends thus on the roughness factor, i.e., the ratio of the real to the apparent surface. The theory of the average or apparent contact angles on surface where there are spaced air gaps presumes also that the small air gaps should be regularly spaced. The barbules of the duck's feathers, extremely good as a water repellent, are about 8μ in diameter and regularly spaced every 40μ .

The aquatic plant *Salvinia* sheds water perhaps even more effectively than the duck, utilizing its leaf projections whose outer ends are loops of hydrophobic material. Some aquatic insects utilize a similar principle to remain under water almost indefinitely and to make use of oxygen for respiration (ADAM 1958).

The wettability of leaf surfaces varies from plant to plant and may be of practical importance — the efficiency of chemicals applied to leaves may depend on it (JUNIPER 1959).

The wettability of the glossy leaf surface of maize seedlings as compared with the water repellency of the normal one was recognized as soon as the glossy mutants were described (*gl* vs. *Gl*).

As pointed out by HAYES and BREWBAKER (1928) the character expresses itself as a glossy appearance of the surface of the leaves of maize seedlings. The normal seedlings shed water almost completely, while the glossy seedlings retain drops on the surface of the leaf, whenever they are sprinkled with water. When dipped in water the normal seedling leaves reflect light strongly from the water/leaf surface interface, while, on the contrary, the glossy ones appear quite dull. This is, incidentally, the most dependable method for a reliable classification of seedlings as *Gl* or *gl* seedlings, when the distinction is not clear-cut and experience with the material not very great.

However, the exact chemical and/or physico-chemical nature of such differential behaviour to water has not been clarified. This may be due to the fact that the conventional optical microscopy was not in a position to detect very fine structures, beyond the resolution of the microscope, and new techniques for the electron microscope are recent developments.

Some observations conducted by us with light microscopes actually have not shown great differences between the normal surface and the glossy one, except a greater iridescence in the latter. Consequently attempts have been made to utilize electron microscope techniques.

Studies dealing with morpho-physiological analysis of genetic effects to a similar level seem almost absent in the present pertinent literature.

Methods and Material

As pointed out by JUNIPER (1959) the low penetrating power of the electron beam prevents its use for a direct observation of a surface. Attempts to circumvent this difficulty, by using reflection electron microscopy, were limited by a resolving power with this technique only a little above that of the light microscope and by the distortion of the image. However, observing such material as leaf surfaces in the electron microscope may be achieved by using a surface replica. A negative template of the surface is made of a material that should be transparent and inert in the electron beam. The negative replica may be examined directly in the microscope; to avoid material that necessitates wetting of the leaf surface, evaporated carbon has been proposed as replica material. Carbon is inert, noncrystalline and can replicate detail down the $1\text{ }\mu$ level.

Details of the method adopted for the present study were a modification of the technique suggested by BRADLEY and JUNIPER (1957). This method has been criticised on the basis that waxes of the leaf surface could be affected by radiation from the high-temperature carbon arc (SCHIEFERSTEIN and LOOMIS 1959). On the other hand, JUNIPER and BRADLEY (1958) have remarked that the method described by MUELLER, CARR and LOOMIS (1954), involving the wetting of the leaf, could dissolve the wax and destroy some of the surface structure of the leaf. Since the scope of the present study is to compare the normal with the glossy leaf surface, it is thought that the controversy is somewhat beyond our problems, on the basis, also, of the results obtained in our experiments. A portion of the leaf to be examined is fixed to a glass slide with a plastic adhesive "Sleek", avoiding touching the surface that will be used for the study and the assembly is placed in an evaporating plant 6—7 cm away from the leaf surface while two carbon rods are lightly pressed together. When a vacuum is made in the chamber containing the slide and the rods, an alternating current of 15 V and 60 A is passed through the carbon rods for 6—7 seconds. Under such conditions a carbon vapour is deposited on the leaf surface. Subsequently the carbon arc is replaced by a tungsten wire on which are put 5—6 mg of a gold alloy (Pressor). Thus the specimens are shadow-cast with gold at an angle of about 20° ; the value of such an angle permits one to calculate the depth of the gaps between the projections, and raises the contrast of the specimen in the electron beam.

The metallized surface is covered with a thin layer of amyl acetate containing 4% of collodion and then with 'Formvar' (polyvinyl formalin) in concentrated 1:2-dichloro-ethane solution. Scotch tape is superimposed and the leaf is stripped away, while the replica adheres to the tape. The latter is dipped in benzene, which, by dissolving the tape's adhesive, enables the replica to be recovered. This is cleaned of the 'Formvar' in 1:2-dichloro-ethane. Our replicas were about $250\text{ }\text{\AA}$ in thickness. Exposures in the electron microscope were made at a magnification 2500 X on orthochromatic film 'Tensi'. The final prints were enlarged from intermediate negatives to give magnifications approximately four times the original negatives.

Seedlings of maize of fairly uniform genetic background, segregating however for gl_1 , gl_2 , gl_3 and gl^H were used for the study of the effects of hereditary factors on the submicroscopic structure of the surface of the first five leaves: gl_1 is known to be located in chromosome 7, gl_2 in chromosome 2, gl_3 in chromosome 4, and gl^H in chromosome 9. The classification of gl_1 and gl_2 is easy in early seedling stage; gl_3 is better classified in still earlier stage, while gl^H can be promptly recognized by examining the third and fourth leaves.

Germination was started in the greenhouse and growth was continued in it during the months of January-April 1960, at a temperature of about $19\text{--}22^\circ\text{C}$. Artificial light was provided for 14 hours a day by 9 fluorescent lamps of 40 W each, placed at a distance of 50 cm from the soil surface.

Cuticle samples were prepared from the central part of the leaf blade. For the first leaf this was done 26 days after planting; for leaf No. 2, 34 days after planting; for leaves No. 3, 4 and 5, respectively 42, 50 and 58 days after planting. Since the material was fairly uniform, all the examined plants were, for every sampling, at a similar stage of development.

Results

Leaf samples were obtained from 4—16 seedlings for each F_2 and reproduced *via* their replica in the way described above; of such seedlings half were *gl* and half normal (*Gl*—). As a rule each of the first five leaves were analysed for every seedling.

The material that has been used consisted of the F_2 generation: consequently into the normal surface class fall both genotypes *GlGl* and *Glgl* (— *Gl*—). They are indistinguishable by macroscopic examination and so far they seem indistinguishable at the submicroscopic level. The normal seedlings did not show the heterogeneity that would have been expected if the heterozygotes differed from both the homozygotes. Therefore, although no particularly critical data are available, in the present paper the normal *Gl* type will include the apparently similar phenotypes of both the genotypes *GlGl* and *Glgl*.

Since all the normal seedlings showed practically the same phenotype, in the different families, only one example is contrasted with the different *gl* alleles (Fig. 1). Among these, however, there are significant differences not all of which are detectable at the macroscopic level. In fact the *gl^H* seedlings are usually of a glossy appearance, if for classification only the third, fourth and fifth leaves are taken into consideration. On the other hand, differences among *gl₁*, *gl₂* and *gl₃* are not obvious when a scoring is made at sight. However, as it is evident from the micrographs assembled in fig. 1, *gl₂* and *gl₃* together with the third fourth and fifth leaves of *gl^H* present a somewhat intermediate situation between the cuticle of *Gl* seedlings and that of *gl₁* seedlings. Again, and with some detail, an inspection of fig. 1, where the micrographs form a reasonably representative sample¹ of the leaves studied under the described conditions, indicates: (1) all the five normal (*Gl*—) leaves present conspicuous wax extrusions, with a modest reduction of the wax structure in the later leaves; (2) all the leaves of *gl₁* seedlings, on the contrary, appear practically devoid of wax; (3) the *gl₃* leaves present few wax bodies, and, what is perhaps more important, they are markedly reduced in size; (4) *gl₂* in turn is intermediate between *gl₁* and *gl₃*, showing a condition similar to *gl₃* for the leaves 1st and 2nd, and a situation which repeats that of the leaves 4th and 5th of *gl₁* for its 4th and 5th leaves, the 3rd leaf turning out exactly intermediate between the correspondent leaves of *gl₁* and *gl₃*, respectively; (5) *gl^H* has the first two leaves that are macroscopically and in the fine structure similar to the normal ones, while the third and the fourth, which are macroscopically of glossy appearance are also similar in their minute structure to the glossy character and especially to *gl₃*; the fifth leaf is, however, of typical extreme glossy

¹ Although the electron microscope field is obviously small compared with the whole leaf area, since there was no significant variation among the different samples of the same genotype, it is thought that, for the purposes of our comparison, it is of minor importance to demonstrate that the same genotype might differentiate in the various leaf areas. No such differentiation, at any rate, has been found in the different positions which have been analyzed.

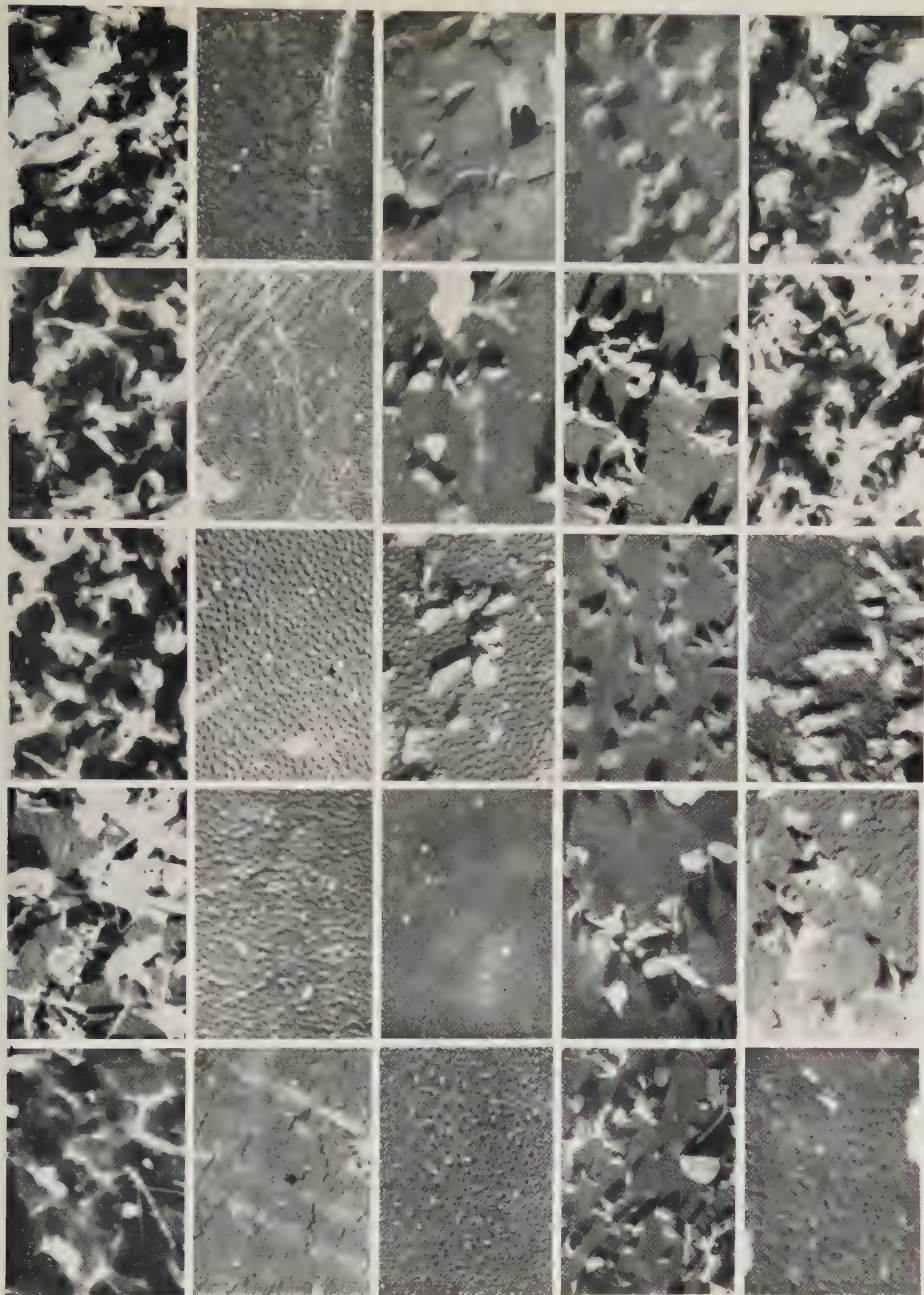


Fig. 1. Electron micrographs of leaf surfaces of maize. All magnifications 10,000 diam. (1 cm = 1 μ). Measurement (h) of the height of the projections can be made through the formula $h = d \tan 20^\circ$ where d is the extension of the corresponding shadows. From left to right, column 1 for GL , column 2 gl_1 , column 3 gl_2 , column 4 gl_3 and column 5 gl^H . The first row (from the top) for the first leaves, the second one for the second leaves and so on

appearance. As mentioned elsewhere every effort has been made to obtain the leaf samples as much as possible in the same stage of development. The findings

seem then to suggest that gl_1 (and, to some extent, gl_2) is very late in starting the covering of its cuticle with extruded wax if it ever does so (older stages of the same leaves are being studied together with the superior leaves of the same genotypes presented in this paper), while the other gl — alleles seem more similar, to some extent and although in varying degrees, to the normal condition.

It will be noted, moreover, that the results presented in this paper show that the Gl factors turn out as dominant, also taking into account their effects on fine structure, as they appear at a macroscopic analysis.

Discussion

According to the findings by SCHIEFERSTEIN and LOOMIS (1959) the primary cuticle appears to form rapidly on the walls of the seedling living cells which are exposed to air. It may well be that the different glossy alleles in maize control mainly the time at which this and subsequent phenomena take place.

According to the same authors (1956 and 1959) surface wax is deposited only on young leaves, and chiefly during or shortly after the period of leaf expansion. Deposition is probably related to the development and solidification of the cuticular layer. Since the cited authors were unable to find any evidence of wax channels or any residual effect of the passage of the wax through the cuticle, they assume that the extrusion is in the form of a soft paste and that it ends when the wall and/or the cuticle become so solidified as to inhibit movement of this kind. The differential behaviour of Gl , gl_1 , gl_2 , gl_3 , and gl^H genotypes described in this paper, may provide the means for a better understanding of the process and does demonstrate a genotypic control of the above mentioned process. JUNIPER (1959) also pointed out that closely related plant species usually have similar wax patterns, although very different pictures have been detected even in species of the same genus, as well as for the same material under different temperature and light conditions. Our results clearly demonstrate that within the same species, under artificially controlled uniform conditions, the replacement of a single allele may result in a striking difference in the fine structure of the extruded wax.

Summary

The wettability of leaf surface in maize seedlings may vary according to the genotypes, Gl or gl . Techniques in electron microscopy have made it possible to resolve the fine structure of the Gl — surface as contrasted with those of gl_1 , gl_2 , gl_3 , and gl^H . The normal surface shows minute projections which are almost absent in the glossy surface of young seedlings gl_1 ; the gl_2 , gl_3 and gl^H seedlings present a somewhat intermediate situation.

Acknowledgment. Thanks are due to Mr. A. LODIGIANI who helped in taking electron micrographs with the electron microscope of the Agricultural Faculty of "Università Cattolica del S. Cuore" in Piacenza, and to Dr. B. E. JUNIPER and Mr. R. A. E. TILNEY-BASSETT (Botany School, Oxford, England) for critical reading of the manuscript and valuable suggestions.

Literature

- ADAM, N. K.: Water repellency. *Endeavour* **17**, 37—41 (1958).
BRADLEY, D. E., and B. E. JUNIPER: Electron microscopy of leaf surfaces. *Nature* (Lond.) **180** (4581), 330—331 (1957).

- HAYES, H. K., and H. E. BREWBAKER: Glossy seedlings in maize. *Amer. Naturalist* **62**, 228—235 (1928).
- JUNIPER, B. E.: The surfaces of plants. *Endeavour* **18**, 20—25 (1959).
- JUNIPER, B. E., and D. E. BRADLEY: The carbon replica technique in the study of the ultra-structure of leaf surfaces. *Ultrastruct. Res.* **2**, 16—21 (1958).
- MUELLER L. E., P. H. CARR and W. E. LOOMIS: The submicroscopic structure of plant surfaces. *Amer. J. Bot.* **41**, 593—600 (1954).
- SCHIEFERSTEIN, R. H., and W. E. LOOMIS: Wax deposits on leaf surfaces. *Plant Physiol.* **31**, 240—247 (1956).
- SCHIEFERSTEIN, R. H., and W. E. LOOMIS: Development of the cuticular layers in Angiosperm leaves. *Amer. J. Bot.* **46**, 625—635 (1959).

Dr. A. BIANCHI,
Istituto di Genetica vegetale dell'Università Catt. del S. Cuore,
Piacenza, Italien

Department of Zoology, Columbia University, New York

PHENOCOPIES INDUCED BY THYMINE IN *ESCHERICHIA COLI**

By

RIVKA RUDNER and FRANCIS J. RYAN

With 2 Figures in the Text

(Received June 30, 1960)

Auxotrophic strains of *E. coli*, when starved for their required growth factors, may be overgrown by stable back mutants arising among them. These adaptive overgrowths are rare events and occur at rates characteristic of the mutant strain and the environmental conditions under which it is grown (RYAN 1955, 1959). While investigating such phenomena, we discovered an unusual cause of overgrowth in certain strains requiring uracil for their normal growth. All cultures of these u^- strains when starved for uracil eventually grow. The adaptive overgrowths are brought about by two kinds of bacteria. The first is a stable uracil-independent mutant (u^+) which transmits its character to its offspring; the second is a phenotypic variant (u^\perp) whose uracil-independent character is not inherited indefinitely. The progeny of u^\pm bacteria are able to grow in the absence of uracil until they reach the sugar-limited stationary phase; thereafter, upon transfer, they lose this ability and behave again as u^- bacteria. Thymine increases the rate with which non-heritable u^\pm bacteria appear. Because the u^\pm bacteria were able to engage in the synthesis of uracil without having undergone a change in genotype, they behaved as phenocopies mimicking the u^+ phenotype.

Materials and Methods

All the mutants used in these experiments were derived from *Escherichia coli* strain 15. The thymineless strains were produced from a single ancestral stock. They require, in addition, either uracil (t^-u^-), uracil and arginine ($t^-u^-a^-$) or phenylalanine (t^-q^-). Their properties have been described in detail (BARNER and COHEN 1958, KANAZIR, BARNER, FLAKS and COHEN 1959) and we appreciate Dr. SEYMOUR COHEN's kindness in allowing us to use them. The uracilless strain (u^-) was isolated in our laboratory as a single-step back mutant of t^-u^- . In other experiments an independently arising histidineless mutant (h^-) of strain 15 was employed.

The method used to detect the two types of adaptations has been described elsewhere (RYAN 1955, 1959). Basically it involves suspending a washed culture of, say, u^- bacteria at a concentration of ca. 10^7 per ml. in chemically defined medium supplemented with 0.05 per cent (w/v) of sterile-filtered lactose and devoid of uracil. Two ml. aliquots, initially not turbid, are distributed into several hundred small tubes which are then incubated at 37° C. Viable counts are made every 48 hours by plating appropriate dilutions from a sample of unadapted cultures onto minimal agar supplemented with 20 μ g. uracil per ml. or the same concentration of both uracil and thymine and appropriate concentrations of other supplements when needed. Upon incubating these liquid cultures for several hundred hours, the number of viable bacteria decreases according to the equation:

$$N_t = N_0 e^{-kt}$$

where N_0 is the average number of bacteria per culture at time 0, N_t is the number of viable bacteria at time t , and k , the death rate constant.

From day to day the tubes are checked for adaptations, identified as turbid cultures. These are streaked on agar medium devoid of uracil to determine whether the cause of adap-

* This research was supported in part, by grants from the American Cancer Society, the U. S. Public Health Service and the National Science Foundation.

tation was genetic or non-genetic. From time to time as adaptations occur, the fraction of tubes still not turbid ($P_{(0)}$) can be determined. From the zero term of the Poisson equation:

$$P_{(0)} = e^{-m}$$

the average number of events (m) leading to the two types of over-growth can be calculated. The chance of mutation per bacterium per generation (a) during growth, and per hour (μ) during starvation, were calculated from m by methods described elsewhere (RYAN 1955).

In experiments on the induction of phenocopies, the same procedure was followed except that the tubes were supplemented with 10 μg . thymine per ml. Chemical studies involved the use of thymine labelled with C^{14} in the 2 position. To trace the label the treated cells were pooled and washed after they had been identified as u^- , u' , or u^+ . Their nucleic acids were extracted by a modified Schmidt-Thannhauser procedure using 5 per cent perchloric acid. The cold and hot fractions were pooled, concentrated with N_2 and hydrolyzed with 7.5 N perchloric acid. The nitrogenous bases were isolated by paper chromatography using n-butanol (80 per cent (v/v) and saturated with 5 per cent NH_4OH) as the solvent. The spots were eluted in 0.1 N HCl and the eluant was divided into two parts, one for radioactivity determination and the other for u. v. absorption.

Results

Identification of phenocopies. The two types of adapted cultures can be distinguished by streaking them on agar medium without uracil. The genetic

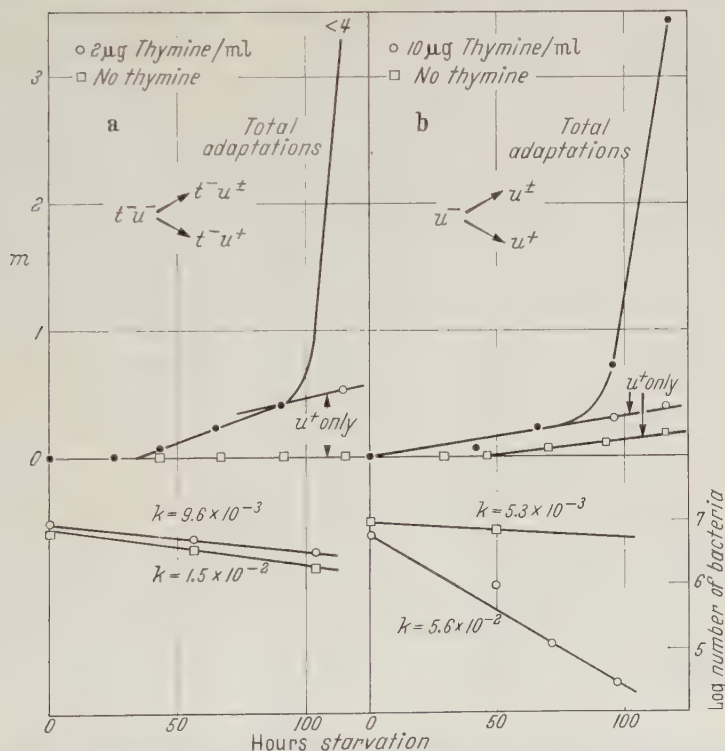


Fig. 1. Increase in the average number of events (m) leading to uracil-independent adaptations among u^- bacteria starved for uracil but in the presence or absence of thymine. In the case of the u^- strain, an average of only 0.06 u^+ mutants were inadvertently introduced upon suspension; but 0.32 $t^- u^-$ mutants were introduced with each $t^- u^-$ culture. In the latter case a break in the curve for genetic mutants can be seen at an m of about 0.4 from which the chance of mutation per bacterium per generation (a) during the previous growth is calculated to be 3×10^{-8} . In the case of the u^- strain the rate of mutation to u^+ per cell per hr (μ) during starvation was 8×10^{-10} in the presence of thymine and 1×10^{-9} in its absence

adaptations grow immediately, forming confluent streaks in one day as do wild-type, uracil-independent prototrophs. The phenocopies, on the other hand, do not grow for several days; thereafter, the viable cells in the streak form only microcolonies which gradually and heterogeneously increase in size as u^+ and u^\pm reversions occur among them. The same morphology results when t^-u^- bacteria are streaked on thymine agar devoid of uracil.

Fig. 1 shows the origin in time of the two kinds of adaptations occurring in liquid cultures of strains u^- and t^-u^- . Although heritable mutations to u^+ continue to occur at a steady rate, eventually non-heritable u^\pm phenocopies also overgrow the cultures. In the presence of thymine the latter occur more rapidly. The overgrowths by the thymine-induced phenocopies, which begin about 90 hours after the onset of the experiment, thereafter occur so rapidly that within a few days all of several hundred cultures may be turbid, terminating the experiment. In the absence of thymine, however, the phenocopies occur at a slower rate so that the behavior of the unadapted cultures can be observed for a long time.

Thymine had no inducing effect on the adaptation of h^- , t^-q^- or $t^-u^-a^-$ cultures when they were starved for histidine, phenylalanine or arginine, respectively. In our experience only the u^- mutant here described produces phenocopies in this way.

Cell death. In this uracilless strain thymine does not replace uracil for growth. In liquid cultures, both in the presence and in the absence of thymine, there is initially no increase in population size in the absence of uracil; rather there is slow death so that the number of viable bacteria decreases at an exponential rate (k) of ca. 10^{-2} per hour (Fig. 1). This is slower than in the case of the t^-u^- strain

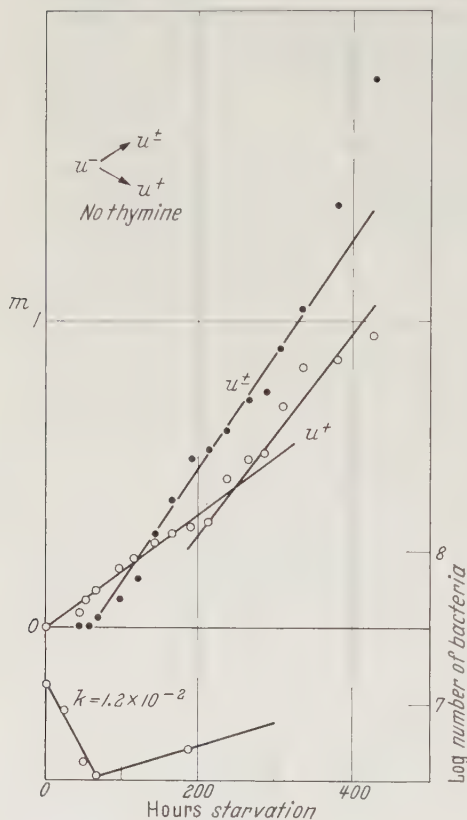


Fig. 2. Increase in the average number of mutations to u^+ and of events leading to u^\pm phenocopies among u^- bacteria starved for uracil in the absence of thymine. The chances of occurrence of these events per bacterium per hr (μ) as judged from the initial slopes were 5×10^{-10} and 9×10^{-10} respectively. Initially the u^- bacteria died exponentially but after about 150 hrs they began gradually to increase in number. Because of this growth mutations to u^+ became more frequent and a change in rate of increase in m took place. Similarly, but after a longer delay, the initial linear rate of increase in m for the u^\pm phenocopies accelerated for the same reason

starved for both pyrimidines, and much slower than the rate of death of this strain during starvation for thymine alone (BARNER and COHEN 1958). Although initially these u^- cultures die slowly, after some 150 hours the number of viable bacteria begins to increase (Fig. 2). At about 200 hours the unadapted cultures all begin to show visible turbidity; this gradually increases until after some 450 hours all of the cultures are so turbid that identifying the adaptations becomes impossible.

Random occurrence of phenocopies. Fig. 2 shows that the rate of appearance of phenocopies is constant in the absence of thymine. Although it could be argued that the cumulative data represent a very flattened random distribution of times of adaptation, it seems more likely that there is a constant chance per bacterium per hour ($\mu = 9 \times 10^{-10}$) of developing a phenocopy. This discontinuity which mimics mutation (see also NOVICK and WIENER 1957) is expressed as heterogeneity in the size of microcolonies formed when u^- cells are streaked on agar lacking uracil.

Thymine acts by increasing the chance of developing a phenocopy; it has no effect on genetic reversions to u^+ , the rates of mutation, μ , in its presence and absence being on the average 8×10^{-10} and 5×10^{-10} per bacterium per hour.

Chemical studies. In view of the fact that u^\pm phenocopies developed so readily in the presence of thymine, tracer experiments were performed to determine whether the adapted cells could convert thymine into uracil. Liquid cultures of u^- bacteria were allowed to adapt in the presence of thymine labelled in the 2 position with C^{14} . Three kinds of cells were collected and washed; u^- bacteria were taken after exposure to thymine for only 18 hours before any adaptations occurred, while the u^\pm and u^+ bacteria were identified among the adaptations which took place later and were pooled with members of their class. From each type of sample nucleic acids were extracted, hydrolyzed, and their nitrogenous bases separated by paper chromatography so that specific activities could be determined.

The results are shown in the Table. In the u^- bacteria, which did not grow because they were starved for uracil while exposed to thymine- C^{14} , only about 6 per cent of the original specific activity was found in the thymine recovered from the DNA. Much more incorporation of thymine- C^{14} was found in the DNA from u^\pm and u^+ bacteria which grew in its presence, the thymine recovered from them having about 30 per cent of the specific activity of the introduced compound. The uracil isolated from the u^\pm and u^+ bacteria had only a tenth of the specific activity of the introduced thymine. On the other hand, the uracil from the u^- bacteria had just a trace of activity. The same relationship was found for cytosine which is probably derived from uracil. Adenine and guanine in all cases had much less specific activity than did the pyrimidines. It therefore seems clear, since the uracil does not have the same specific activity as the added thymine- C^{14} , that all of it is not formed directly by demethylation of thymine (see SELLS 1960). However, some of the label enters the pyrimidines and, to a much smaller extent, the purines.

Table. *The relative specific activities of bases from the nucleic acids of u^- bacteria exposed to thymine- C^{14} and of u^\pm and u^+ bacteria which developed in its presence*

Compound	Specific activity-c. p. m. per μ mole	Relative specific activity
1. u^- culture; specific activity of added thymine = 2.9×10^6 c. p. m. per μ mole		
thymine . . .	1.8×10^5	0.062
uracil . . .	1.9×10^3	0.00066
cytosine . . .	1.2×10^3	0.00041
adenine . . .	4.9×10^2	0.00017
guanine . . .	2.8×10^2	0.000097
2. u^\pm culture; specific activity of added thymine = 4.4×10^4 c. p. m. per μ mole		
thymine . . .	1.4×10^4	0.32
uracil . . .	1.4×10^3	0.032
cytosine . . .	1.4×10^3	0.032
adenine . . .	2.1×10^2	0.0048
guanine . . .	1.6×10^2	0.0036
3. u^+ culture; specific activity of added thymine = 4.4×10^4 c. p. m. per μ mole		
thymine . . .	1.0×10^4	0.23
uracil . . .	4.6×10^2	0.010
cytosine . . .	1.0×10^3	0.023
adenine . . .	2.1×10^1	0.00048
guanine . . .	2.9×10^1	0.00066

Discussion

The logarithmic growth of the phenocopies in the absence of uracil shows that they have become able to synthesize that compound. Usually an adaptation brought about by the development of phenocopies involved a 50-fold increase in the number of bacteria in the absence of uracil; in some experiments, where the phenocopies were transferred during growth before deadaptation, the cell number increased some 100-fold. Furthermore, there was about the same distribution of C^{14} from thymine to uracil in the u^- as in the u^+ bacteria.

The fact that thymine stimulates the appearance of phenocopies suggests that it, or one of its breakdown products, stimulates the formation of an adaptive system. In the absence of exogenous thymine, this process could be initiated by thymine formed upon the degradation of DNA. But thymine, normally synthesized from uracil, could not be the only substrate for uracil formation because phenocopies grow in the absence of thymine. Moreover, there was a gradual growth (Fig. 2) of the u^- bacteria, independent of mutation or phenocopy formation. This suggests that the u^- bacteria have a residual ability to synthesize uracil and that the relevant enzyme(s) may be induced to an optimal level by thymine or its products. The induction, which seems to occur in an all-or-none fashion, resembles the discontinuous appearance of β -galactosidase as studied by NOVICK and WIENER (1957).

SHAININ (1958) described the synthesis of dehydroorotic acid dehydrogenase induced by the presence of uracil. Our u^- bacteria grow, even if after a delay, on orotic acid. For this reason, and because the u^\pm phenocopies arise in the absence of uracil, dehydroorotic acid dehydrogenase may not be the enzyme involved.

KANAZIR *et al.* (1959) have shown that t^-u^- bacteria lack the enzyme aspartate transcarbamylase which forms ureidosuccinic acid, a precursor of pyrimidines. We have not, however, shown that this enzyme is restored in either u^- or u^+ bacteria.

The fact that uracil is synthesized in the u^\pm and u^+ bacteria, and that thymidylic acid is normally synthesized from deoxyuridylic acid probably accounts for the low specific activity in the thymine recovered from such cells. In both u^\pm and u^+ cells there was relatively more activity in the pyrimidines than in the purines, suggesting either that thymine is broken down into products more readily used in pyrimidine synthesis or that some of the thymine actually is demethylated. Our chemical studies end without allowing us to be specific on this point or to identify critically the enzyme(s) uniquely active in the u^- and u^+ bacteria.

Whatever the biochemical mechanism, it appears that the phenocopies are enzymatically capable of synthesizing uracil after a considerable lag, while they are growing and while the inducing conditions prevail (absence of uracil and presence or absence of thymine). This capacity is lost through whatever metabolism occurs in the stationary phase (see MANDELSTAM 1958). Thymine does appear to act as an inducer but its role as a substrate is partial at best.

There is no reason to suppose that the phenocopies are really unstable mutants of the sort studied by ZAMENHOF *et al.* (1958a and b) and SMITH-KEARNY (1958). The ability to grow in the absence of uracil is lost early in the stationary phase but, unanticipated by the hypothesis of unstable mutants, this capacity can be stabilized by transferring the phenocopies while they are in the process of growing, before they deadapt. This is true even when a single adapting culture

is fractionated into some twenty subcultures, demonstrating that what has been identified as a phenocopy is in reality not a line (OZEKI 1956, KAUDEWITZ 1955, LEDERBERG 1956). Rather it appears that the phenocopies involve an enzymatic adaptation which is easily lost.

The u^+ bacteria mimic the u^- bacteria; both can synthesize uracil and grow rapidly in its absence, and the distribution of the label from the added thymine- C^{14} is essentially the same in both (Table). Because the u^+ bacteria copy the phenotype of the u^- mutants without the involvement of a change in genotype, we propose to call them phenocopies (GOLDSCHMIDT 1938). Other instances of phenocopy formation in bacteria have been reported (eg. RAVIN and NORMAN 1951).

Summary

A uracilless strain of *E. coli* upon starvation for uracil adapts to synthesize this compound. These adaptations are of two sorts, heritable and non-heritable. The latter are induced by the presence of thymine although little or none of the uracil is synthesized by the demethylation of thymine. The non-heritable adaptations arise in a discontinuous fashion at a rate 10 times as high as the genetic reversions. The non-heritable uracil-independent cells are considered to be phenocopies because they mimic the phenotype of the genetic revertants.

Bibliography

- BARNER, H. D., and S. S. COHEN: Protein synthesis and RNA turnover in a pyrimidine-deficient bacterium. *Biochim. biophys. Acta* **30**, 12—23 (1958).
- GOLDSCHMIDT, R.: *Physiological genetics*. New York: McGraw-Hill Book Comp. 1938.
- KANAZIR, D., H. D. BARNER, J. G. FLAKS and S. S. COHEN: Some physiological and genetic properties of *Escherichia coli* requiring thymine, arginine and uracil. *Biochim. biophys. Acta* **34**, 341—353 (1959).
- KAUDEWITZ, F.: Zur verzögerten Ausprägung UV-induzierter Reversionen einer Lysin-Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium*. *Z. Naturforsch.* **10**, 562—572 (1955).
- LEDERBERG, J.: Linear inheritance in transductional clones. *Genetics* **41**, 845—871 (1956).
- MANDELSTAM, J.: Turnover of protein in growing and non-growing populations of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **69**, 110—119 (1958).
- NOVICK, A., and M. WEINER: Enzyme induction as an all-or-none phenomenon. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **43**, 553—566 (1957).
- OZEKI, H.: Abortive transduction in purine-requiring mutants of *Salmonella typhimurium*. *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 612; *Genetic studies with bacteria*, 97—106 (1956).
- RAVIN, A. W., and A. NORMAN: Studies on a non-heritable physiological modification in *Aerobacter aerogenes*. *Experientia (Basel)* **8**, 108—110 (1952).
- RYAN, F. J.: Spontaneous mutation in non-dividing bacteria. *Genetics* **40**, 726—738 (1955).
- RYAN, F. J.: Bacterial mutation in the stationary phase and the question of cell turnover. *J. gen. Microbiol.* **21**, 530—549 (1959).
- SELLS, B. H.: The effect of thymidine upon the incorporation of uracil into *Bacillus cereus*. *Biochim. biophys. Acta* **40**, 548—549 (1960).
- SHAININ, R.: Formation of enzymes involved in pyrimidine synthesis and amino acid metabolism in *Escherichia coli*. *J. gen. Microbiol.* **19**, 365—579 (1958).
- SMITH-KEARNY, P. E.: An unstable mutation in *Salmonella typhimurium*. *Nature (Lond.)* **181**, 1672 (1958).
- ZAMENHOF, S., R. DE GIOVANNI and S. GREER: Induced gene unstabilization. *Nature (Lond.)* **181**, 827—829. (1958a)
- ZAMENHOF, S., S. GREER and R. DE GIOVANNI: Study of spontaneous gene unstabilization in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **75**, 510—513 (1958b).

Aus dem Max Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen

DIE NORMALISIERUNG GENETISCH BEDINGTER DEFEKTE
DER ZELLTRENNUNG BEI *PARAMAECIUM AURELIA*
DURCH SAUERSTOFFMANGEL UND KOHLENMONOXYD

Von

ROLAND MALY

(Eingegangen am 13. Juni 1960)

Einleitung

Bei *Paramecium aurelia* kennt man 2 Stämme, die sich durch eine Hemmung der Zelltrennung auszeichnen: bei normalem Wachstum und geregelter Kernteilung ist lediglich die Trennung der Tochtertiere in wechselndem Ausmaß gestört, und es kommt zur Bildung von Monstra, die aus mehreren Einheiten bestehen.

Das Phän beider Stämme ist fast identisch, die genetischen Ursachen aber sind verschieden: *snaky* ist durch ein einfach mendelndes rezessives Gen bedingt. Beim *Monstra*-Stamm (*Mo*-Stamm) hingegen induziert ein Gen in plasmatischen Strukturen oder Partikeln eigener genetischer Kontinuität einen irreversiblen Defekt. Um welche Partikeln der Zelle es sich handelt, muß zur Zeit noch offengelassen werden. Jedenfalls sind zelleigene Strukturen gemeint, deren normale Funktion die Durchschnürung bei der Zellteilung ermöglicht. Das Plasma von Tieren des *Mo*-Stammes enthält ein Gemisch genetisch verschiedener, nämlich intakter und defekter Partikeln. Durch Selektion innerhalb eines Klonen kann die Häufigkeit unvollendeter Teilungen gesteigert oder vermindert werden. Dagegen ist die Merkmalsausprägung bei *snaky* durch Selektion nicht beeinflussbar: im *snaky*-Plasma sind die genetisch identischen, in sich intakten Partikeln durch das Gen modifiziert. Die Parallele zu den Plastiden wurde aufgezeigt und betont, daß *snaky* den direkt genetisch gesteuerten Plastidendefekten vom *chlorina*- oder *albina*-Typ entspricht, während die Verhältnisse beim *Mo*-Stamm, der von RHOADES (1943) beschriebenen *iojap*-Form beim Mais vergleichbar sind (MALY 1958, S. 417ff.).

Nach Klärung der formalgenetischen Seite des Problems der Monstra-Bildung erhob sich die Frage nach den physiologischen Ursachen der merkwürdigen Abnormität. Die ersten Ansatzpunkte zu einer Lösung ergaben sich aus 2 Beobachtungen (l. c. S. 403): 1. Kulturen von *snaky* und vom *Mo*-Stamm werden normal, d. h. sie bilden keine Monstra mehr, wenn man sie in Röhrchen anstatt in Petri-Schalen oder „slides“ züchtet. 2. In Isolierungen aus autogamen Kulturen ist die Monstra-Bildung bei *snaky* etwas vermindert, beim *Mo*-Stamm stark reduziert oder ganz unterdrückt.

Die nachstehend berichteten Untersuchungen führen zu einer Schlußfolgerung von allgemeinerem Interesse. Im Gegensatz zum neoplastischen Wachstum, bei dem der Pasteur-Effekt aufgehoben ist, scheinen bei den beiden *Paramecium*-

Stämmen glykolytische Prozesse, die offenbar für das normale Funktionieren der Zelldurchschnürung nötig sind, besonders empfindlich gegen eine zu starke Atmung zu sein.

Material

Paramaccium aurelia, Syngen 4: *Mo*-Stamm und *snaky* sind die erwähnten Stämme, die die Hemmung der Zelltrennung zeigen. Zum Vergleich wurde *d-4-6* als Normalstamm herangezogen. Die verwendeten Stämme sind frei von *Kappa*.

Methoden

Für die Untersuchungen wäre ein definiertes vollsynthetisches Medium wünschenswert gewesen. Die bisher bekannten axenischen Medien erlauben aber keine stärkere Vermehrung als etwa 3 Teilungen pro Tag, und es ist schon nicht einfach, Versuche, bei denen man gesicherte Werte über die Häufigkeit von Teilungen erhalten will, bei einer Vermehrungsrate von ~ 5 Teilungen pro Tag zu machen. Daher wurde bisher ausschließlich Salatmedium (baked lettuce medium), beimpft mit *Aerobacter aerogenes*, verwendet. Die sonstigen Standardbedingungen: Temperatur 27° C, Dunkelheit, pH 6,6 (Einstellung durch Phosphatpuffer, Konzentration des Puffers im Medium 1/100 n).

Die Versuche mit Gemischen verschiedener Gase wurden in Fernbach-Kolben durchgeführt. Um eine gute Diffusion der Gasmischung ins Medium zu erreichen, mußte die Schichtdicke der Kulturflüssigkeit gering gehalten werden, denn dauerndes Schütteln drückt die Teilungsrate der Paramácien stark herab, und ein Durchperlen des Mediums mit verschiedenen Gasgemischen hätte einen unverhältnismäßig hohen technischen Aufwand erfordert. Ein 300 ml-Fernbach-Kolben wurde jeweils mit 20 ml Medium beschickt.

Für die Experimente mit den Stoffen Jodessigsäure, Natriumfluorid und Dinitrophenol wurden normale Petri-Schalen oder Erlenmeyer-Kolben (Bodendurchmesser 10 cm) mit 15 ml Medium verwendet.

Die Zahl der Tiere — es handelt sich dabei stets um Einzeltiere eines Klones —, mit denen ein Versuch begonnen wurde, war so bemessen, daß sie in 3 Tagen rund 10 Teilungen durchlaufen konnten und die Bakterien dabei aufgebraucht wurden. In ein Volumen von 20 ml wurden 30 Tiere, in 15 ml 18 Tiere zu Beginn eines Versuches angesetzt.

Die Variabilität des Merkmals und die quantitative Auswertung

Eine starke Variabilität der Merkmalsausprägung ist beim *Mo*-Stamm zu erwarten. Sie ist durch das wechselnde, zufallsbedingte Verhältnis intakter und defekter Partikeln in den einzelnen Zellen genetisch begründet. Daneben spielen sicher noch äußere Faktoren eine Rolle, die auch bei *snaky* eine wechselnde Stärke der Merkmalsausprägung verursachen, und die durch die Verwendung eines schwer standardisierbaren Mediums mit lebenden Bakterien unübersichtlich bleiben. Es ist daher unerlässlich, bei jedem einzelnen Versuch ausreichend Kontrollserien mitlaufen zu lassen und das Ergebnis eines Versuches stets auf die Werte der Kontrollen zu beziehen.

Das Maß der Merkmalsausprägung ist die Häufigkeit unvollendeter Teilungen bezogen auf die Gesamtzahl stattgefundener Teilungen. Es wird so ermittelt, daß zunächst in einer Stichprobe von 1 ml alle Einzeltiere, Monstra und auch die Zahl der Einheiten, aus denen ein Monstrum besteht, ausgezählt werden. Tabelle 1 gibt ein Auswertungsbeispiel für den *Mo*- und den *snaky*-Stamm und zeigt zugleich, wie sich das Phän der beiden Stämme voneinander unterscheidet.

Der Anteil von Monstra mit 2 Einheiten ist bei *snaky* stets entschieden höher als beim *Mo*-Stamm, dafür sind Monstra mit mehr als 4 oder 5 Einheiten bei *snaky* relativ seltener anzutreffen als beim *Mo*-Stamm. Man kann sagen, daß bei *snaky* die Hemmung der Durchschnürung über alle abgelaufene Teilungen gleichmäßiger verteilt, dafür aber eher reversibel ist wie beim *Mo*-Stamm.

Aus technischen Gründen werden für die Berechnung unvollendeter Teilungen nur die Monstra mit 3 und mehr Einheiten herangezogen. Dadurch wird auch vermieden, daß die beim Normalstamm sporadisch auftretenden Tiere, die aus 2 Einheiten bestehen, in die Rechnung eingehen. Die Monstra mit 3 und mehr Einheiten werden nicht nur in der Stichprobe,

Tabelle 1. *Beispiele für die quantitative Erfassung der Merkmalsausprägung*

a) *Mo*-Stamm. Kontrolle; Petri-Schalen, 15 ml Medium, 18 Tiere Einsaat (Versuch vom 26.—29. 2. 60)

In 1 ml werden ausgezählt:

In 1 m. werden ausgesetzt:									
	Einzel- tiere	Monstra mit							Σ
		2	3	4	5	6	7	8	
		Einheiten							
vollendete Teilungen	408	18	3	2	1	1	1	1	435
Gesamteinheiten.	408	36	9	8	5	6	7	8	487
unvollendete Teilungen		18	6	6	4	5	6	7	52

34

In den restlichen 14 ml werden gefunden:

		Monstra mit						Σ
		3	4	5	6	7	8	
		Einheiten						
Das sind unvollendete Teilungen . . .		50 100	24 72	6 24	3 15	2 12	1 7	230
Gesamtpopulation		7305	unvollendete Teilungen				230 in 14 ml	
Abzüglich Einsaat		18					34 in 1 ml	
		7287					264 in 15 ml	
stattgefundene Teilungen =							264 : 7287 = 3,6 %	

b) *snaky*. Kontrolle; Petri-Schalen, 15 ml Medium, 18 Tiere Einsaat (Versuch vom 26. bis 29. 2. 60)

In 1 ml werden ausgezählt:

	Einzel- tiere	Monstra mit			Σ
		2	3	4	
		Einheiten			
vollendete Teilungen	468	150	8	3	629
Gesamteinheiten	468	300	24	12	804
unvollendete Teilungen		150	16	9	175

25

In weiteren 4 ml werden gefunden:

		Monstra mit		Σ
		3	4	
		Einheiten		
Das sind unvollendete Teilungen		42	14	126
		84	42	
erfaßte Population . . .	4020	unvollendete Teilungen		126 in 4 ml
Abzüglich Einsaat . . .	6			25 in 1 ml
	<u>4014</u>			<u>151 in 5 ml</u>
stattgefundene Teilungen =				151:4014=3.8%

Erläuterung zu Tabelle 1. Die 1. Zeile gibt die faktische Auszählung der Stichprobe wieder, die Summe abzüglich der Einsaat entspricht der Zahl vollendeter Teilungen. In der 2. Zeile ist die Gesamtzahl der Einheiten berechnet, deren Summe abzüglich der Einsaat die Bezugsgröße „stattgefundene Teilungsschritte“ liefert. In der 3. Zeile ist die Anzahl unvollendeter Teilungen eingetragen.

sondern in der Gesamtkultur bzw. in einer erweiterten Stichprobe von 5 ml erfaßt. Die Bezugsgröße „stattgefundene Teilungsschritte“ in der Gesamtkultur liegt meist zwischen 5000 und 20000.

Die Teilungsraten werden bestimmt nach $N=2^n$, wobei N die Zahl der Einheiten, n die Teilungsrate ist. Den Berechnungen der Teilungsraten ist die 1 ml-Stichprobe und in solchen Fällen, in denen die Teilungsrate stärker herabgesetzt war, die Gesamtauszählung einer erweiterten Stichprobe von 5 ml zugrunde gelegt.

Ergebnisse

1. Die Wirkung verminderten Sauerstoffgehaltes

Die Tabellen 2a und 2b geben aus insgesamt 41 Versuchen (*Mo*-Stamm 9 Versuche, *snaky* 27 Versuche, *d-4-6* 5 Versuche) je 3 Beispiele für *Mo*-Stamm und *snaky* wieder. Das übereinstimmende Ergebnis aller Versuche ist, daß *Mo*-Stamm und *snaky* bei reduziertem Sauerstoffgehalt keine Störung der Zelltrennung mehr zeigen und vom Normalstamm nicht mehr unterschieden werden können. Wie ein Vergleich der Tabellen 2a und 2b lehrt, reagiert *snaky* prompter auf Sauerstoffmangel als der *Mo*-Stamm: bei *snaky* ist die Merkmalsausprägung bei einem Sauerstoffgehalt von 5% schon sehr stark vermindert und bei 2%

Tabelle 2. Versuche mit Sauerstoff-Argon-Gemischen, Versuchsdauer 72 Std

(Für alle Tabellen gilt: % uv. T. = Prozentsatz unvollendeter Teilungen; T.r. = Teilungsrate; N = Gesamtzahl stattgefundener Teilungen.)

O ₂ -Gehalt der Gas- mischung in %	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N
a) <i>Mo</i> -Stamm									
20	2,65	8,6	11420	3,45	9,2	18070	5,65	8,2	9880
10				1,40	9,5	20520	5,60	9,0	15090
5	2,30	8,9	14310	0,90	8,8	13600	6,80	9,2	16830
2,5				0,55	8,5	10660	3,40	8,0	7660
1	0,55	8,6	11370	0,00	6,1	2680	0,00	5,6	1540
0,2	0,00	7,1	4170						
0,02	0,00	<1,0	80						
b) <i>snaky</i>									
20	12,0	9,4	1013	5,4	9,4	4955	5,3	8,5	2700
5	0,7	10,0	1514						
2,5	0,3	9,9	1443						
2				0,03	9,6	6010	0,0	9,2	4480
1	0,0	9,9	1446						
0,2	0,0	9,6	1148	0,00	2,6	45	0,0	8,0	1940

und noch weniger Sauerstoff ganz verschwunden, während beim *Mo*-Stamm mitunter sogar eine verstärkte Merkmalsausprägung bei 5% Sauerstoff gegenüber der Kontrolle festzustellen ist. Dieselbe Erfahrung wurde schon beim Vergleich von Kulturen in Schalen und Röhrchen gemacht: *snaky* wird in Röhrchenkultur schneller normal als der *Mo*-Stamm.

Bei *snaky* ist die Teilungsrate bei mäßig reduziertem Sauerstoffgehalt (5%, 2% O₂) stets gegenüber den Kontrollen (20% O₂) gefördert. Ähnlich, aber mit größeren Schwankungen, liegen die Verhältnisse beim *Mo*-Stamm, während bei *d-4-6*, dem Normalstamm, die Teilungsrate im Bereich von 2—20% O₂ praktisch unverändert bleibt.

Stark variabel von Versuch zu Versuch ist aber die Empfindlichkeit der Tiere gegen starken Sauerstoffmangel, die sich in den Teilungsraten ausdrückt. In mehreren Versuchen mit *snaky* ist die Teilungsrate bei 0,2% O₂ etwa um ein Drittel gegenüber der Kontrolle gesenkt. In anderen Experimenten ermöglicht dieser geringe Sauerstoffgehalt keine Teilung mehr oder wirkt gar letal. Versuchsfehler durch undichte Kolben sind ausgeschlossen, denn die Kolben wurden stets mit leichtem Überdruck gefüllt. Paramäcien können nicht in reiner Argon-Atmosphäre längere Zeit überdauern.

Eine Steigerung der Merkmalsausprägung durch erhöhten Sauerstoffgehalt (40, 60, 80% O₂) scheint bei *snaky*, aber nicht beim *Mo*-Stamm möglich zu sein, doch erlauben die wenigen Meßdaten noch keine schlüssigen Aussagen.

2. Der lichtreversible Kohlenmonoxydeffekt

Die Normalisierung vom *snaky*- und *Mo*-Stamm kann ebenso durch geringe Kohlenmonoxydmengen bei gleichbleibendem Sauerstoffgehalt erreicht werden. Die wesentlichen Resultate aus insgesamt 31 Versuchen sind in den Tabellen 3 und 4 enthalten.

Die Tabellen 3a und 3b zeigen, daß der Kohlenmonoxydeffekt lichtreversibel ist, d. h. die Merkmalsausprägung bleibt bei den beiden Stämmen im vollen Maß erhalten, wenn die mit Kohlenmonoxyd versetzte Kultur im Licht wächst.

Tabelle 3. Versuche mit Kohlenmonoxyd-Sauerstoff-Argon-Gemischen, in Licht und Dunkelheit

Gasmischung			Licht (3 000 Lux)			Dunkel		
CO-%	O ₂ -%	Ar-%	% uv.T.	T.r.	N	% uv.T.	T.r.	N
a) <i>Mo</i> -Stamm (Versuchsdauer 72 Std)								
0	20	80	17,0	8,7	12830	8,3	10,1	1595
5	20	75	33,0	9,7	1230 ¹	0,3	6,3	2330
10	20	70	18,0	9,5	1076 ¹	0,2	5,6	1430
20	20	60	17,2	9,0	744 ¹	0,0	4,7	770
b) <i>snaky</i> (Versuchsdauer 48 Std, nur je 1 ml Stichprobe ausgewertet, Einsaat pro Versuchsgefäß 260 Tiere)								
0	20	80	3,3	6,5	1563	5,0	6,4	1452
5	20	75	1,2	6,2	1263	0,4	4,8	465
10	20	70	4,5	6,4	1457	0,0	3,5	201
20	20	60	4,8	5,9	1010	0,0	2,7	111

¹ Nur 1 ml Stichprobe ausgewertet.

Die Teilungsraten sind jedoch schon bei der geringsten Kohlenmonoxyddosis (5%) im Dunkeln stark herabgesetzt. Es mußte daher untersucht werden, ob nicht schon bei noch geringeren Kohlenmonoxydkonzentrationen, welche die Teilungsraten nicht so stark beeinflussen, eine Normalisierung der Zelltrennung zu beobachten ist.

Wie aus Tabelle 4 zu ersehen ist, kann tatsächlich eine merkliche Normalisierung der Kulturen mit so geringen Kohlenmonoxydmengen erreicht werden, daß die Teilungsraten gegenüber den Kontrollen nur unwesentlich — kaum 10% — herabgesetzt sind. Dieser Befund ist sehr wichtig, denn es ist eine bekannte Tatsache, daß geringe Kohlenmonoxydkonzentrationen, die die Atmung

Tabelle 4. Versuche mit Kohlenmonoxyd-Sauerstoff-Argon-Gemischen im Dunkeln, Versuchsdauer 72 Std

Gasgemisch			Mo-Stamm						snaky					
CO-%	O ₂ -%	Ar-%	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N
0	20	80	4,1	10,1	27000	1,1	10,1	32300	9,7	9,2	8760 ²	10,2	9,2	864
1	20	79	3,9	10,0	23800	1,2	9,9	27900	3,8	9,3	17860			
2,5	20	77,5	2,7	8,8	10900	0,1	9,4	20850	1,9	8,8	13100	0,32	9,3	942
5	20	75	0,5	7,4	4140	0,0	7,8	6660	0,9	6,9	6800	0,0	6,8	173
7,5	20	72,5							0,5	5,8	3360	1		

¹ Nur je 1 ml Stichprobe ausgewertet. ² 5 ml Stichprobe.

nicht beeinträchtigen, den Pasteur-Effekt aufheben (Literatur bei HOFFMANN-OSTENHOF 1954, S. 706). Für eine völlige Normalisierung bedarf es allerdings in den meisten Fällen schon solcher Kohlenmonoxydmengen, die eine Verlangsamung des Wachstums um 25—50% gegenüber den Kontrollen bewirken. Der Normalstamm *d-4-6* ist bezüglich der Teilungsrate gegenüber Kohlenmonoxyd gleich empfindlich wie *snaky* und *Mo*-Stamm.

3. Versuche mit verschiedenen Inhibitoren

a) *Kaliumcyanid*. Wenig ergiebig verliefen die Experimente mit Kaliumcyanid, das in Konzentrationen von 5×10^{-5} bis 8×10^{-4} molar im Medium gelöst

Tabelle 5. Die Wirkung von 2,4-Dinitrophenol

Konzentration in mol	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N
a) <i>Mo</i> -Stamm									
0	3,8	8,8	7835	8,1	7,9	4455	1,5	9,5	13280
10 ⁻⁵	11,3	7,7	3840	5,2	8,0	4715	2,0	9,2	10480
2,5 × 10 ⁻⁵	7,5	8,3	5720	2,4	8,1	4815	1,4	9,2	10590
5 × 10 ⁻⁵	1,4	8,9	8500	0,0	6,2	1290	0,5	9,3	11275
7,5 × 10 ⁻⁵	0,9	8,3	5655	0,0	5,9	1065	7,7	6,7	1830
10 ⁻⁴	1,2	7,3	2835	0,0	5,8	1005	8,0	7,2	2658
b) <i>snaky</i>									
0	2,2	10,2	1360	10,4	10,0	1239			
10 ⁻⁵	2,8	10,1	1281	9,0	10,0	1196			
2,5 × 10 ⁻⁵	1,5	9,7	1004	9,0	9,6	893			
5 × 10 ⁻⁵	0,6	9,7	993	3,9	9,0	624			
7,5 × 10 ⁻⁵	0,4	9,4	770	4,7	9,1	669			
10 ⁻⁴	0,0	9,0	613	4,4	8,5	441			
autogam									
0	5,1	9,4	792	15,2	8,5	447	postautogam (s. Text)		
10 ⁻⁵	5,6	9,3	753	8,5	8,9	555			
2,5 × 10 ⁻⁵	5,5	9,5	849	7,6	8,4	407			
5 × 10 ⁻⁵	5,9	8,6	461	3,9	8,4	411			
7,5 × 10 ⁻⁵	6,0	8,5	433	6,2	8,7	504			
10 ⁻⁴	6,5	8,4	394	6,4	8,5	438			

geboten wurde. Ergebnissen, die eine statistisch signifikante Senkung der Merkmalsausprägung zeigten, stehen entgegengesetzte Resultate gegenüber. Auf die Anwendung von Blausäure im Gasgemisch wurde im Hinblick auf die größere Spezifität der Kohlenmonoxydwirkung verzichtet.

b) 2,4-Dinitrophenol und Jodessigsäure. Die Versuche mit den Gasmischungen legen die Annahme nahe, daß die Hemmung der Zelltrennung Ausdruck einer oxydativ beeinflußten Stoffwechselstörung bei den aberranten Paramäciensstämmen ist. Trifft die im letzten Abschnitt angedeutete Vermutung zu, daß die aerobe Glykose beim *snaky*- und *Mo*-Stamm durch die Atmung gehemmt ist (Pasteur-Effekt), dann müßte sich bei Anwendung von Dinitrophenol die Merkmalsausprägung senken und umgekehrt durch Glykolyse-Inhibitoren steigern lassen. Beide Voraussagen haben sich erfüllt, wenn auch im einzelnen die Resultate sehr schwankend waren und erst aus einer großen Anzahl von Versuchen ein Überblick gewonnen werden konnte.

Der Effekt vom Dinitrophenol auf die Merkmalsausprägung ist stark konzentrationsabhängig. Die kleine Auswahl aus insgesamt 22 Versuchen in Tabelle 5

Tabelle 6. Die Wirkung von Jodessigsäure

Konzentration in mol	Autogam			Nicht autogam		
	% uv. T.	T. r.	N	% uv. T.	T. r.	N
a) <i>Mo</i> -Stamm						
0	0,1	9,4	11780	0,2	10,1	20000
10^{-5}	0,2	9,1	10150	0,5	10,0	18210
$2,5 \times 10^{-5}$	0,2	9,5	12900	0,3	9,5	13490
5×10^{-5}	0,5	9,4	12350	1,1	9,6	13560
$7,5 \times 10^{-5}$	1,2	6,2	1305	1,7	9,4	12180
10^{-4}	5,1	3,8	255	1,3	9,1	9820
2 Versuche vom gleichen Tag mit Tieren des gleichen Klones						
0	0,8	8,6	6930	5,3	9,1	9860
10^{-5}	3,1	7,5	3252	3,1	9,2	10500
2×10^{-5}	5,9	7,3	2760	4,4	9,2	10350
3×10^{-5}	4,5	7,0	2310	2,0	9,6	14190
b) <i>snaky</i>						
0	2,8	8,6	7050	4,1	10,3	1416
10^{-5}	3,4	9,3	10910	6,5	10,3	1464
2×10^{-5}	1,8	8,8	7890	9,1	10,0	1226
3×10^{-5}				10,1	9,8	1072
4×10^{-5}	3,8	8,9	8575			
5×10^{-5}				7,4	9,9	1096
6×10^{-5}	4,7	8,5	6350			

zeigt, daß eine optimale Wirkung im Sinne einer Normalisierung im Konzentrationsbereich von 5×10^{-5} bis $7,5 \times 10^{-5}$ mol liegt. Geringere oder höhere Konzentrationen führen sogar zu einer stärkeren Monstrabildung als in den unbehandelten Kontrollen. Daneben gibt es auch Versuchsergebnisse, in denen die Monstrabildung im geprüften Konzentrationsbereich überhaupt unbeeinflußt bleibt. Welche inneren und äußeren Bedingungen dieser Varianz zugrunde liegen, kann zur Zeit nicht gesagt werden. Interessant ist der Vergleich der beiden letzten Versuche in Tabelle 5b, die zum gleichen Zeitpunkt und in demselben Medium angesetzt wurden. Die Tiere beider Versuche entstammen dem gleichen Klon, nur waren die einen autogam, die anderen standen knapp vor der ersten postautogamen Teilung zu Beginn des Versuches. Selbst bei dem geringen Umfang des ausgewerteten Materials ist die teilweise Normalisierung durch Dinitrophenol (5×10^{-5} mol) bei den postautogamen Tieren gegenüber der Kontrolle statistisch gesichert, während bei den autogam isolierten Tieren keine Andeutung eines Effektes vorliegt.

Noch deutlicher äußern sich schwer kontrollierbare Einflüsse bei den Versuchen mit Jodessigsäure. Auch hier stehen Resultate mit drastischen Erhöhungen der Monstrabildung durch Jodessigsäure neben negativen Ergebnissen (s. Tabelle 6). Aufschlußreich ist die Gruppierung der einzelnen Versuche mit dem

Mo-Stamm nach der Wirksamkeit der Jodessigsäure, wenn dabei die Stärke der Merkmalsausprägung in den für jedes Experiment maßgebenden, unbehandelten Kontrollen beachtet wird (Tabelle 7). Für *snaky* liegen zuwenig Daten vor.

Es zeigt sich nämlich, daß Jodessigsäure eine verstärkte Monstrabildung — unabhängig davon, ob die Tiere bei Beginn des Versuches autogam waren oder nicht — vor allem dann verursacht, wenn die Merkmalsausprägung bei den verwendeten Tieren in den unbehandelten Kontrollen nur gering ist. Nehmen wir

Tabelle 7 (s. Text)

	Keine Erhöhung der Monstrabildung durch Jodessigsäure	Verstärkung der Monstrabildung durch Jodessigsäure auf das			
		1,1—2fache	2,1—5fache	5,1—10fache	über 10fache des Kontrollwertes
% uv. T. in der Kontrolle	1,3 (a)	4,7	3,9 (a)	0,8 (a)	0,1 (a)
	8,1	2,2	1,7	0,2	
	5,3	4,1 (a)	0,7 (a)		

(a) = die Einsaattiere waren autogam.

Anmerkung. Bei der geringen Zahl von Daten (12) liegt der Korrelationskoeffizient ($r = -0,43$) für die Beziehung der beiden Meßgrößen: Stärke der Merkmalsausprägung in den Kontrollen und Wirksamkeit der Jodessigsäure noch innerhalb der Zufallsgrenzen.

an, daß auf Grund der nie ganz übersehbaren Vorgeschichte des verwendeten Tiermaterials der Stoffwechsel weitgehend normal verläuft und damit verbunden kaum Störungen bei der Zelltrennung auftreten, dann gibt Tabelle 7 einen Hinweis dafür, daß beim *Mo*-Stamm eben dieser normale Verlauf empfindlich gegen Jodessigsäure ist. Andererseits bedeutet ein höherer Prozentsatz unvollendeter Teilungen bei den Kontrollen, daß im Stoffwechsel schon eine Störung vorliegt, die durch Jodessigsäure offenbar nicht noch mehr verstärkt werden kann. In der Diskussion wird gleich darauf zurückzukommen sein.

Die andere mögliche Erklärung für geringe Merkmalsausprägung beim *Mo*-Stamm, nämlich einen geringen Anteil defekter Partikeln im Plasma anzunehmen, scheidet hier vor allem beim Vergleich autogamer und nichtautogamer Kulturen aus. Denn die „Normalisierung“ in den Teilungen nach einer Autogamie kann nichts mit einer Konzentrationsänderung defekter Partikeln zu tun haben. Wie früher gezeigt wurde (MALY 1958, S. 403), steigt die Manifestation des Monstramerkmals schon bei Re-Isolierungen von Tieren 3 Teilungen nach der Autogamie stark an.

Bei den Resultaten, die entgegen der Erwartung eine Verminderung der Monstrabildung zeigen, muß daran gedacht werden, daß die Jodessigsäure nicht nur mit der Triosephosphat-Dehydrogenase, sondern auch mit anderen SH-haltigen Fermenten reagieren kann.

Die Jodessigsäure wird bei normalem Sauerstoffgehalt der Atmosphäre im geprüften Konzentrationsbereich sehr gut vertragen, wie die in Tabelle 6 notierten Teilungsraten zeigen. Sehr empfindlich sind dagegen die Tiere schon gegen geringe Konzentrationen der Jodessigsäure bei vermindertem Sauerstoffgehalt. Eine Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ mol drückt bei 2% O_2 die Teilungsrate auf die Hälfte bis ein Drittel der Kontrollen bei 20% O_2 ; $7,5 \times 10^{-5}$ mol wirkt bereits tödlich. Das gilt grundsätzlich gleich — natürlich mit den entsprechenden

Schwankungen, wie sie schon bei den Versuchen mit vermindertem Sauerstoffgehalt im Abschnitt I geschildert wurden — für den *Mo*-Stamm, *snaky* und *d-4-6*, den Normalstamm.

Die Wirkung der Jodessigsäure im Sinne einer verstärkten Störung der Zelltrennung ist sauerstoffabhängig, denn bei vermindertem Sauerstoffgehalt im Versuchskolben treten auch bei Gegenwart von Jodessigsäure keine Monstra auf.

Beim Normalstamm *d-4-6* kann auch bei genügendem Sauerstoffgehalt und subletalen Konzentrationen von Jodessigsäure keine Monstrabildung hervorgerufen werden.

Versuche mit Natriumfluorid wurden nur in sehr geringem Umfang durchgeführt, sie ergaben bisher keine gesicherte Erhöhung der Monstrabildung.

Diskussion

Die beiden monstrabildenden *Paramaecium*-Stämme verhalten sich grundsätzlich gleich: Sauerstoffmangel oder Atmungshemmung durch Kohlenmonoxyd führt zu einer normal funktionierenden Zelltrennung. Dinitrophenol, ein Entkoppler von Atmung und Phosphorylierung, bewirkt ebenfalls eine teilweise oder in manchen Fällen vollständige Normalisierung; Jodessigsäure dagegen erhöht — allerdings nur bei Gegenwart genügender Sauerstoffmengen — die Häufigkeit von Monstrabildung. Die genetisch auf verschiedene Weise bedingten Defekte beim *Mo*-Stamm und *snaky* zeigen eine Reihe von Charakteristika jener Regulation des Stoffwechsels, die als Pasteur-Phänomen bekannt ist: die Unterdrückung der aeroben Glykolyse durch die Atmung.

Damit ist zunächst aber auch nicht mehr als eine äußere Ähnlichkeit festgestellt, denn die Ergebnisse und Schlußfolgerungen beruhen nur auf einem rein biologischen Test. Es werden die Häufigkeit unvollendeter Teilungen und die Vermehrungsrate unter verschiedenen Bedingungen beobachtet. Stoffwechselmessungen fehlen — zum Großteil durch die Ungunst des Objektes bedingt.

Trotzdem muß man fragen, ob sich aus den Daten nähere Anhaltspunkte für die Art des Unterschiedes der beiden aberranten Stämme zum Normalstamm gewinnen lassen. Die Versuche mit vermindertem Sauerstoffgehalt weisen darauf hin, daß die Paramäcien unter nahezu anaeroben Bedingungen ihren Energiebedarf auf glykolytischem Weg decken können. Dafür spricht auch die letale Wirkung geringer Jodessigsäurekonzentrationen bei vermindertem O₂-Gehalt, die gleichartig für alle 3 geprüften Stämme ist. Es ist aber offenbar so, daß beim *Mo*-Stamm und *snaky* — im Gegensatz zum Normalstamm — irgendein Glykolyse-schritt empfindlich gegen eine zu starke Atmung ist, wie der „heilende“ Effekt vom Kohlenmonoxyd oder Sauerstoffmangel ganz klar zeigt.

Die Befunde über die Wirksamkeit der Jodessigsäure in Zusammenhang mit dem „Zustand“ der Tiere (Tabelle 7) geben noch einen weiteren Hinweis: Der atmungsempfindliche Teilschritt der Glykolyse liegt wahrscheinlich vor dem Angriffspunkt der Jodessigsäure, denn sonst hätte diese in jedem Fall wirken müssen. Wir haben aber gesehen, daß die Jodessigsäure vor allem dann im Sinne einer verstärkten Monstrabildung wirksam wird, wenn der Stoffwechsel so normal verlief, daß die Frequenz unvollendeter Teilungen nur sehr gering war.

Wiederholt wurde die vorübergehende Normalisierung der Zelltrennung beim *Mo*-Stamm und *snaky* als Folge einer Autogamie erwähnt. Bei der Autogamie, die ein Befruchtungsprozeß ohne Paarung ist, zerfällt der alte Makronukleus und wird innerhalb der nächsten Teilungen im Plasma resorbiert. Phosphate müßten dabei in der Zelle im Überschuß frei werden. Wir kommen damit zum Pasteur-Phänomen zurück. Die heute am weitesten akzeptierte Erklärung des Pasteur-Effektes haben unabhängig voneinander LYNEN und JOHNSON vorgeschlagen. Sie erklären die Unterdrückung der Glykose durch die Atmung mit einer Konkurrenz um das anorganische Phosphat in der Zelle, die unter aeroben Bedingungen dazu führen kann, daß für den phosphaterfordernden Teilschritt der Glykolyse ($3\text{-Phosphoglycerinaldehyd} + \text{DPN} + \text{H}_3\text{PO}_4 \rightleftharpoons \text{DPN} \cdot \text{H}_2 + 1,3 \text{ Diphosphoglycerinsäure}$, das ist derselbe Reaktionsschritt, der durch Jodessigsäure hemmbar ist) kein Phosphat mehr zur Verfügung steht und damit die Glykolyse gehemmt wäre. Im Zusammenhang mit der Lynen-Johnson-Theorie der Konkurrenz um das Phosphat sei nochmals auf die „normalisierende“ Wirkung vom Dinitrophenol verwiesen.

Fügen sich somit alle hier mitgeteilten Versuchsergebnisse zwanglos in den Rahmen eines Pasteur-Phänomens ein, so darf doch nicht vergessen werden, daß die eigentliche Frage, warum sich die Zellen der abnormen Stämme nicht immer zu durchschnüren vermögen, noch immer unbeantwortet ist. Vielleicht handelt es sich letztlich darum, ob an der betreffenden Stelle, wo die Durchschnürung mittels Kontraktion stattfinden soll, genügend energiereiches Phosphat zur Verfügung steht (H. H. WEBER 1955). LYNEN (1957) hat in einer neueren Betrachtung zum Pasteur-Effekt den Gedanken geäußert, daß bei der Atmung ATP aus dem Cytoplasma in die Mitochondrien verschoben wird. Es bleibt abzuwarten, ob die defekten „Partikeln“ beim *Mo*-Stamm bzw. die vom Gen modifizierten Partikeln bei *snaky* sich als zu stark atmende Mitochondrien (eine Permeabilitätsänderung der Mitochondrienoberfläche ohne Atmungsänderung wäre genau so gut denkbar) oder als ein Enzymkomplex im Cytoplasma herausstellen werden.

Summary

Of two strains of *Paramecium aurelia* Syngen 4, one differs from the normal form by a gene-induced cytoplasmic mutation (*Mo*-strain), the other by a simple gene mutation (*snaky*). Both strains have a very similar character: the cells fail to separate with a variable frequency and monster formation results (Table 1).

The phenotype of the two strains can be completely normalised by low oxygen tension (Table 2) or by the presence of carbon monoxide. The CO effect is reversible by light (Table 3, 4). 2,4-Dinitrophenol reduces the frequency of monster formation, sometimes to zero (Table 5). Iodoacetic acid, on the other hand, causes a tenfold increase in monster formation over the controls under certain conditions (Table 6).

The facts are discussed in relation to the Pasteur phenomenon.

Fräulein R. NIERLICH danke ich für geschickte Hilfe bei den Versuchen.

Literatur

- HOFFMANN-OSTENHOF, O.: Enzymologie. Wien 1954.
- JOHNSON, M. T.: The role of aerobic phosphorylation in the Pasteureffect. *Science* **94**, 200 (1941).
- LYNEN, F.: Über den aeroben Phosphatbedarf der Hefe. Ein Beitrag zur Kenntnis der Pasteurschen Reaktion. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **546**, 120 (1941).
- LYNEN, F.: Phosphatkreislauf und Pasteureffekt. *Proc. Internat. Symp. Enzyme Chem. Tokyo and Kyoto 1957*, S. 24.
- MALY, R.: Eine genetisch bedingte Störung der Zelltrennung bei *Paramaecium aurelia* var. 4. Ein Beitrag zum Problem der Mutabilität plasmatischer Systeme. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 397 (1958).
- RHOADES, M. M.: Genic induction of an inherited cytoplasmic difference. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **29**, 327 (1943).
- WEBER, H. H.: Kontraktile Proteine und Motilität bei Lebewesen. *Die Naturwissenschaften* **42**, 270 (1955).

Dr. ROLAND MALY, Max Planck-Institut für Biologie, Abtg. Melchers, Tübingen/N,
Corrensstr. 41

Institute of Animal Genetics, Edinburgh

SENSITIVITY OF THE *DROSOPHILA* TESTIS TO THE MUTAGENIC ACTION OF MUSTARD GAS

By

C. AUERBACH and E. M. SONBATI

With 1 Figure in the Text

(Received June 18, 1960)

One of the earliest observations on mustard gas as a mutagen was a characteristic pattern of mutation frequencies when treated ♂♂ were mated to a succession of virgin ♀♀ (AUERBACH 1949). A very pronounced peak of mutation frequency occurred about a week after treatment, and this was followed by a drop in still later broods. While a drop in mutation frequency in late broods was known to occur also after X-radiation of ♂♂, the increase preceding it appeared to be peculiar to mustard gas. However, repetition of the older X-ray experiments with shorter brood intervals showed that X-rays, too, produce their main effect on some immature germ cell stage which in this case could be identified as the spermatid stage (LÜNING 1952; AUERBACH 1953, 1954). Thus, the "brood pattern" of mutation frequencies after treatment with either X-rays or mustard gas was found to constitute a further striking similarity between these agents. Apart from a few other "mustards" with similar brood patterns, urethane was at that time the only other chemical mutagen for which a brood pattern had been obtained (VOGT 1950). The fact that it produced its peak effect in the first brood showed that the sensitivity pattern to X-rays and mustard gas is not a general reaction pattern of the *Drosophila* testis to *all* mutagens; in regard to this aspect of mutagenesis, mustard gas is more truly "radiomimetic" than urethane.

Although these early brood pattern experiments showed that both X-rays and mustard gas exercise their maximal mutagenic effect on some stage between the early spermatogonial divisions and the formation of mature spermatozoa, they did not show whether this stage is the same in both cases. That this might not be so was, in fact, suggested by the brood patterns; for while with our breeding procedure of 3 ♀♀ per ♂ every 3 days the peak of mutation frequency to X-rays usually occurred in the second brood, that to mustard gas usually occurred in the third. The significance of this difference was doubtful; for brood patterns are not rigid and can easily be influenced by incidental conditions such as the choice of ♂♂ or ♀♀ (AUERBACH 1954 and unpub; see also Table 1). In the present case, slower sperm utilization by mustard gas treated ♂♂ might be responsible for the shift of peak mutation frequency to a later brood.

It also seemed possible that the increase in mutation frequency from the first to the third brood was due not so much to differences in treated germ cell stage as simply to passage of time which allowed slow chemical reactions and delayed mutations to go to completion. Although such processes cannot account for the descending part of the brood pattern after the peak, they might at least

contribute to its ascending part. Experiments to test for their presence were carried out by comparing mutation frequencies in later broods with those obtained in spermatozoa that had been stored for corresponding periods of time either in the treated ♂♂ themselves or in untreated ♀♀. When these experiments showed that passage of time, *per se*, cannot explain the increased mutation frequency in intermediate broods, it was concluded that the brood pattern does indeed reflect differences in sensitivity between stages of spermatogenesis, and experiments were undertaken to determine the stage of highest sensitivity.

Two methods were applied. The first makes use of the fact that under the breeding conditions in our laboratory the oldest cells of the testis enter meiosis soon after pupation and complete the whole of spermiogenesis during the pupal stage (KHISHIN 1955). Thus, in successively older pupae the most advanced germ cells — which subsequently will furnish sperm for the first brood — range from early meiotic cells to almost mature spermatozoa. KHISHIN X-rayed pupae of different ages and derived the relative sensitivities of meiotic and spermiogenic stages from a comparison of mutation frequencies in first broods. This cannot be done for a chemical mutagen because penetration into pupae may differ between age classes. Nevertheless, mutation tests on pupae can give useful information when a comparison is made between mutation frequencies in the first and second brood within each age class. The ratio between these frequencies ("brood gradient", AUERBACH and MOSER 1953) changes with the developmental stage of the testis. The most advanced germ cells will be the first to reach peak sensitivity. Up to the time that this happens they will be more sensitive than their successors, and the brood gradient will be higher than 1. Once peak sensitivity has shifted to younger stages, the brood gradient becomes less than 1. The second method (AUERBACH 1954) utilises a dual-purpose stock which allows the detection of induced cross-overs and recessive lethals in the progeny of the same treated ♂♂. Since crossing-over cannot take place after prophase of meiosis, this method provides a landmark for meiosis. In addition, the occurrence and size of bunches of identical or complementary cross-overs from the same ♂♂ provides further landmarks for earlier stages. Although, as PARKER (1948) has shown, apparent bunches may be produced in synchronously dividing cysts of spermatocytes, the increasingly larger bunches in later broods must trace back to treated spermatogonia, younger spermatogonia yielding larger bunches than older ones. Finally, we combined both methods in one experiment in which lethals and cross-overs were scored in successive broods from ♂♂ that had been treated as pupae.

Our results will be reported in the following order. (1) Description of the brood pattern in ♂♂ treated as adults. (2) The effect of passage of time *per se* on mutation frequency in treated spermatozoa. (3) Description of the brood pattern in ♂♂ treated as pupae. (4) Analysis of the brood pattern by means of a dual-purpose stock, which permits the scoring of cross-overs and lethals in progenies of the same treated ♂♂.

Material and Methods

The experiments reported below have been carried out over a period of almost 15 years, and various strains of flies and methods of treatment have been used. In the earliest experiments, mustard gas was applied as aerosol. From 1946 on, the flies were exposed to air

that had previously been sucked over or through liquid mustard gas. Pupae were treated by this latter method only. The amount of mustard gas that actually reached the gonads was not known; but this was of no consequence, since all relevant comparisons were carried out between series within the same experiment.

Variation in age between simultaneously treated flies was limited to a few days in the early experiments, and to less than one day in the most recent ones. After KAPLAN (1954) had found that the mutagenic action of mustard gas, like that of X-rays (STRÖMNAES 1949), is influenced by the time the flies have taken for development, only early hatchers from bottles with good culture conditions were used for treatment. Pupae were timed from the beginning of prepupa formation. For more advanced stages, eye colour was used as an additional check on age, and the final age determination was based on the time that untreated pupae of the same batch and eye colour had required until eclosion.

Treated ♂♂ were mated to a succession of virgin ♀♀, and genetical effects were scored in successive broods. In all early and a few of the later experiments, mass matings with a surplus of ♀♀ were used. This has the disadvantage that the opportunity for mating and, therefore, the speed of sperm utilization may differ between ♂♂. Moreover, mass matings do not allow a distinction between progeny of ♂♂ that were fertile over the entire test period and others that had dropped out prematurely through death or infertility. Since these latter ♂♂ are likely to have had a more than average exposure and, therefore, to carry a more than average frequency of affected chromosomes, their exclusion from later broods will produce a spurious reduction in the frequency of whatever genetical effect is being scored. In most of the later experiments, treated ♂♂ were therefore bred individually, and only offspring of those producing progeny throughout the period of test were kept for scoring. This has the further advantage that pre-existing autosomal lethals and bunches of cross-overs can be detected. Details of breeding procedure will be given in the section on results.

When most of our experiments had already been finished, YANDERS (1958) provided evidence for an important source of error in brood pattern experiments. He showed that even within the same brood, there may be a considerable difference in mutation frequency between samples of ♀♀, late hatchers tending to carry more lethals than early hatchers. This source of error, to which we shall subsequently refer as the "Yanders effect", was unfortunately neglected in our work and may be responsible for some of the observed irregularities in brood pattern.

Before 1947, wild-type flies for treatment came from a Florida strain (*Fo-4*). In 1947, this was replaced by an Oregon strain (*Or-K*), which since then has been used consistently for mutation experiments in this laboratory. Its spontaneous frequency of sex-linked lethals has been tested repeatedly over the course of the years: it varies between 0.1% and 0.3% and never has exceeded 0.5%. In some experiments, the treated ♂♂ carried inversions and/or marker genes; these genotypes will be described in the appropriate places.

In some early experiments, sex-linked lethals were scored by means of a *ClB* chromosome. This was subsequently replaced by a *sc⁸¹InS w^asc⁸* chromosome, and this in turn by the very similar Muller-5 or Basc chromosome (*sc⁸¹InS w^asc⁸*). Some further X-chromosomes with inversions and marker genes will be described in connection with the relevant experiments. Autosomal lethals were scored by the *Cy/L* method; the presence of pre-existing lethals in the treated ♂♂ was ruled out by treating ♂♂ heterozygous for *Cy*, and keeping individual records for each ♂. For the detection of induced crossing-over, ♂♂ heterozygous for a multiply marked second chromosome were backcrossed to the multiply homozygous ♀♀. Translocations were scored by means of recessive markers on the two large autosomes. Large deletions were detected as hyperploid ♀♀ in the progeny of treated ♂♂ and attached-X ♀♀. *Minutes* were used for estimating the frequencies of small deficiencies. This particular class of small deficiency, together with translocations and large deletions, was chosen to represent intergenic changes.

Results

1. *The brood pattern of adult ♂♂.* Data from all brood pattern experiments on recessive lethals are summarized in Table 1. Few comments are required. Four experiments, H 80, H 92, H 97 and H 118, gave almost identical patterns: little or no difference between broods *a* and *b*, an approximate doubling of

Table 1. *The brood pattern after treatment of adults ♂♂ (All effects expressed in percent)*

Exps.	Mating	Treated ♂♂	♀♀	Effect scored	Broods										Comparison between	P
					a	b	c	d	e	f						
					Days*											
					0-3	3-6	6-9	9-12	12-15	15+						
H 80	M	Fo 4	CIB	sll	2.6		4.3	1.4				(a + b) <i>vs</i> c c <i>vs</i> (d + e)	NS NS			
H 92	M	Fo 4	w ^a In	sll	7.0	7.0	14.0	8.8				(a + b) <i>vs</i> c c <i>vs</i> (d + e + f) (a + b) <i>vs</i> c c <i>vs</i> (d + e)	<.001 <.05 <.001 NS			
H 97	M	Fo 4	w ^a In	sll	3.9	4.6	9.3	5.5	5.1	1.8		(a + b) <i>vs</i> c c <i>vs</i> (d + e) e <i>vs</i> f (a + b + c) <i>vs</i> (d + e)	<.001 <.03 <.05 <.001			
H 115	M	w ^a In	CIB	sll	5.7	4.6	5.9	4.0	1.0			No clear pattern				
H 118	I	Cy/Ork	Cy/L	al	4.3	3.8	7.9	2.6				(a + b) <i>vs</i> c c <i>vs</i> d	<.005 <.001			
H 124	I	Ork	M-5	sll	7.2	17.8	14.4					a <i>vs</i> b	<.001			
H 138	I	Ork	M-5	sll	6.1	11.9	19.4	4.4				a <i>vs</i> b c <i>vs</i> d	<.001 <.001			
					Days											
					0-5	5-10	10-17									
H 89	M	w ^a In	dp; e	sll	8.5	13.0	27.2					a <i>vs</i> b (a + b) <i>vs</i> c a <i>vs</i> b	NS <.001 NS			
				tr	1.7	2.8	2.1									

* Day 0 = day on which treated ♂♂ were mated; usually the day following treatment.

NS = statistically not significant; M = mass matings, 20-25 couples per 1/2 pint bottle; I = individual matings, 1 ♂ × 3 ♀; Fo 4 = Florida 4, wild-type; Ork = Oregon K, wild-type; w^aIn = sc⁸In S w^asc⁸; sll = sex-linked lethals; al = autosomal lethals; Min. = minutes; Del = large deletions; tr = translocation.

lethal frequency in brood *c* (statistically highly significant in three experiments), followed by a drop to approximately the level of the first brood. The fact that this drop occurred also in H 118, where autosomal lethals were scored, shows that it cannot be wholly due to germinal selection. In Expt. H 97, in which two more broods were tested, there was a further significant decrease in mutation frequency after the fifth brood. The remaining experiments — with the exception of H 115 — agree in showing a peak of mutation frequency at a stage prior to the formation of mature spermatozoa, although choice of strains and breeding procedures were less favourable for the demonstration of a clear peak in one particular brood. Expt. H 89 shows the influence of rate of sperm utilization on brood pattern. The brood interval in this experiment had been five days instead of the usual three, and this resulted in a shift of peak mutation frequency from between the 6th and 9th day to beyond the 10th. Conversely, in the two experiments with OrK (H 124 and H 138) mutation frequency had increased significantly already in the second brood, perhaps because of speedier utilization of sperm or because of the Yanders effect mentioned in the introduction. The lack of any clear brood pattern in Expt. H 115 was quite obviously due to selective killing. In this experiment, many ♂♂ died after producing one or two broods, and since these ♂♂ presumably had received more than the average share of mustard gas, their withdrawal from the tests must have depressed mutation frequency in subsequent broods.

In H 92 and H 97, additional effects were scored: *Minutes* in H 97, and *Minutes* as well as large deletions in H 92. In H 92, the brood patterns for sex-linked lethals on the one hand, large deletions and *Minutes* on the other coincide; in H 97, the frequency of *Minutes* increased more gradually than that of lethals and reached its peak in a latter brood.

Experiment H 89 was combined with a test for translocations involving the second and third chromosome. A dual-purpose stock was used so that lethals and translocations were scored in the progeny of the same flies, F_1 ♀♀ being used for the scoring of lethals, F_1 ♂♂ for that of translocations. The translocation test was done on a small scale, and its results do not lend themselves to statistical evaluation. Its interest lay in the peculiar distribution of translocations in brood *a*. Altogether 9 translocations were obtained; of these, only 1 was found in 267 sons produced during the first 5 days after treatment; the remaining 8 were found in 246 sons produced during the next 5 days when the treated ♂♂ had already been removed to fresh ♀♀. Thus, the majority of translocations in this brood had taken place in spermatozoa that had been stored in untreated ♀♀ for a period of 1—10 days. No similar difference between the two 5-day periods of brood *a* was found for sex-linked lethals. This observation is relevant to the effects of storing on treated spermatozoa, which will now be described.

2. *The effect of storing on mutation frequency in treated spermatozoa.* Treated spermatozoa were stored in either the treated ♂♂ themselves or in inseminated ♀♀. Periods of time were chosen which in sexually active treated ♂♂ result in increased frequencies of mutations among the progeny. The results, set out in Table 2, show that mustard gas treated spermatozoa do not add to their initial content of recessive lethals when they are stored in either sex. The slight,

Table 2. *The effect of storing on the frequency of sex-linked lethals in treated spermatozoa*

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Expt.	Brood	Days	n	% lethals	Sperm stored in	Period of storing in days	n	% lethals	P (V/IX)
H 103	a	0—3	502	7.4					
					♂	6	442	7.2	
H 97	a	0—3	465	3.9					
	c	6—9	386	9.3	♀	6	509	4.1	< .005
	d	9—12	566	5.5		9	413	3.1	
H 138	a	0—3	1306	6.1					
	b	3—6	1216	11.9	+	3	1394	7.1	< .001
	c	6—9	242	19.4		6	1614	7.9	< .001

Table 3. *The effect of storing on the frequency of complete and fractional Minutes in treated spermatozoa*

Expt.	Brood	Days	n	Minutes			Stored in ♀ for days	Minutes			
				Nbr	%	% fract.*		n	Nbr	%	% fract.
H 97	a	0—3	1081	4	.36	75					
	c	6—9	479	4	.84	75	6	693	7	1.0	71
	d	9—12	997	18	1.8	50	9	426	3	.71	0/3
H 98	a	0—3	4000	52	1.3	71					
	c	6—9	700	17	2.4	41	6	600	16	2.7	38
H 104	a	0—3	—	25	—	80					
	c	6—9	—	28	—	43	6	—	50	—	54
H 107	a	0—3	—	54	—	59					
	c	6—9	—	24	—	50	6	—	19	—	63
	d	9—12	—	23	—	30	9	—	53	—	43

* = percentage of fractional (mosaic) Minutes among all Minutes.

statistically not significant increase of mutation frequency in the stored sperm of Expt. H 138 may be attributed to sampling error; an alternative interpretation will be mentioned below.

Experiments to test the effect of storing on the frequency of induced *Minutes* in treated spermatozoa gave a different result. The data are presented in Table 3. In Experiment H 98 the overall frequency of *Minutes* after 6 days of storing in untreated ♀♀ was the same as in the simultaneously obtained brood *c* and significantly ($P = .01$) higher than that obtained in the first brood. Moreover, in the stored spermatozoa as well as in brood *c* the proportion of fractionals (mosaics) among all *Minutes* had dropped from 71% to about 40%. In Experiment H 97 the brood pattern was less clear than in H 98. Although after 6 or 9 days of storing the overall frequency of *Minutes* was about twice as high as initially, the difference did not reach statistical significance. Neither could it be decided on the available evidence whether the proportion of fractional *Minutes* had

decreased after 9 days of storing, as had happened in the simultaneous brood *d*. In Experiments H 104 and H 107, in which only the percentage of fractionals among *Minutes* was scored, this was found to decrease with time in stored spermatozoa as in successive broods. Because of the reduced viability and delayed developmental speed of *Minutes*, quantitative comparisons involving the scoring of individual *Minute* flies have to be handled with caution. All the same, these data suggest that storing of treated spermatozoa in untreated ♀♀ results both in an increased overall frequency of *Minutes* and a decreased proportion of fractionals among them. The isolated observation on translocations in Experiment H 89, reported at the end of the previous section, suggests that the frequency of translocations, too, may increase with storing. It thus seems possible that, in general, storing of mustard gas treated spermatozoa results in increased frequencies of intergenic changes, while leaving the frequency of

Table 4. *The brood pattern for sex-linked lethals after treatment of male pupae*

Expt.	Stage treated	Nbr fertile ♂♂	Lethals in Brood								Brood gra- dient a/b
			a		b		c		d		
			Days								
			0—3		3—6		6—9		9—12		
			n	% 1	n	% 1	n	% 1	n	% 1	
H 125	1 day after pupation	10	198	10	247	.5	—	—	—	—	20
H 127C		7	80	20.3	69	7.5	—	—	—	—	2.8
H 127B	2 days } before	29	312	8.9	131	13.0	300	2.3	80	0	0.7
MG 3	1 day } eclosion	40	650	3.8	622	6.9	318	11.9	461	3.5	0.6

point mutations unchanged. If this is correct, the slight increase in lethal frequency with storing, observed in Experiment H 138 (Table 2) may be attributed to an increase in the number of lethal rearrangements and deficiencies. In any case, this increase is negligibly small compared with the differences constituting the brood pattern, and these must hence be attributed to real differences between germ cell stages. The following sections describe experiments for correlating the brood pattern with stages of spermatogenesis.

3. *The brood pattern of pupae.* Pupae of different ages were treated with mustard gas, and the eclosed ♂♂ were mated individually to batches of 3 Muller-5 ♀♀ every 3 days. Eclosion was near 100% in all experiments, but many ♂♂ died young or were sterile, and only four experiments yielded sufficient progeny for a comparison of brood patterns. Two of these, H 125 and H 127C, had been carried out on one-day old pupae, and progeny had been obtained in only the first two broods. The other two experiments, H 127B and MG 3, had been carried out on older pupae, and progeny had been obtained in four successive broods. The results are presented in Table 4 and are shown diagrammatically in Fig. 1 together with a representative brood pattern of ♂♂ treated as adults (H 138, see Table 1). The fact that the brood pattern varied consistently with age and, in the oldest pupae, graded into that of the imago, supports the assumption that it represents differences between germ cell stages and is not mainly due to differences in penetration.

The last column of Table 4 gives the "brood gradient", that is the ratio of mutation frequencies between the first two broods. This is one of the most diagnostic features of the brood pattern. It will be seen that the brood gradient is larger than 1 in the two experiments on one-day old pupae, and smaller than 1 in the older pupae. Thus the most advanced germ cells were near or at the peak of sensitivity in one day old pupae and had already passed this peak about two days prior to eclosion. In similar experiments with X-rays (KHISHIN 1955), the oldest germ cells reached peak sensitivity one day prior to eclosion (Fig. 1, right part). This indicates that the most sensitive stage to mustard gas precedes that to X-rays, which occurs in spermatids. Experiments to be described in the next section confirmed this conclusion.

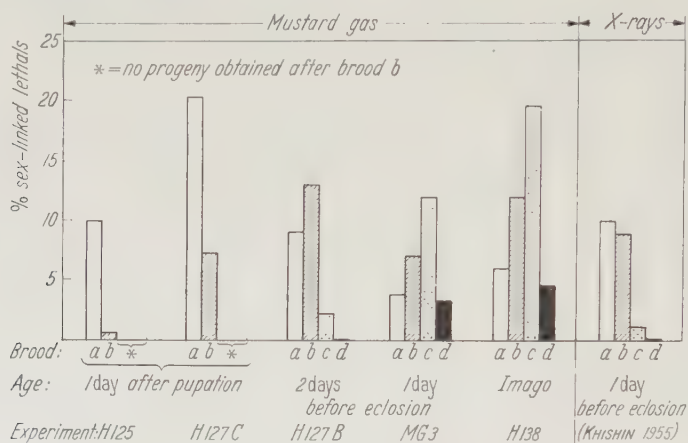


Fig. 1. Brood patterns at various stages of the life cycle

4. *Brood pattern analysis by means of a dual-purpose stock.* An early attempt to locate the stage of maximum sensitivity by relating it to induced cross-overs failed because of the unexpectedly low efficiency of mustard gas in the induction of crossing-over. In an experiment that yielded a peak mutation frequency of almost 9% sex-linked lethals, no cross-overs between *black*, *cinnabar*, and *vestigial* on chromosome II were found in 4700 flies of brood b, 2700 of brood c, and 2000 of brood d. With the same technique, X-ray treatment of the same or lower mutagenic efficiency had yielded many cross-overs (AUERBACH 1954). Since the region between *black* and *vestigial* covers less than one-fifth of the second chromosome, further tests were made with a chromosome marked by *dumpy* (*dp*), *black* (*b*), *cinnabar* (*cn*) and *brown* (*bw*), in which almost the entire length is enclosed between the outermost markers. ♂♂ heterozygous for this chromosome were treated and backcrossed to homozygous ♀♀, and cross-overs were scored in F_1 . Various schemes were used for the scoring of sex-linked lethals in F_2 . The first scheme, designed to avoid interference of eye or body colour genes with the scoring of cross-overs made use of an inverted X-chromosome marked only with miniature (*m*). Since this chromosome proved rather inviable in homozygous condition it was kept balanced over a chromosome marked with Bar (*B*), into which a recessive lethal (*l*) had been introduced.

P₁ Treated ♂♂ + $\frac{dp\ b\ cn\ bw}{++++} \times \text{♀♀} \frac{sc^8\ In\ 49\ m\ sc^8}{l\ B}; \frac{dp\ b\ cn\ bw}{dp\ b\ cn\ bw}$

F₁ (1) ♂♂ and ♀♀ examined for cross-overs

(2) ♀♀ $\frac{sc^8\ In\ 49\ m\ sc^8}{+}$ mated individually to brothers or Muller-5 ♂♂.

F₂ Cultures with 10 or more *m* ♂♂ and no + *m* ♂♂ recorded as lethals.

Cultures with < 10 *m* ♂♂ and no + *m* ♂♂ re-tested.

The result is shown in Table 5. At first sight it suggests that peak sensitivity to mustard gas, as to X-rays, occurs in post-meiotic cells, since the first cross-overs turned up one brood

later than the highest mutation frequency. However, the low fertility of the F₁ cultures rendered the accuracy of the data doubtful. Moreover, the brood pattern was peculiar not only in having its peak in the second brood, but in having a second, minor peak in the fourth. A further peculiar feature was the difference in mutation frequency when the F₁ ♀♀ had been mated

Table 5. Cross-overs and sex-linked lethals in successive broods

Treated ♂♂ 2—3 days old. Brood period 3 days. Mass cultures of 20 ♂♂ to 30 ♀♀.

Brood	Cross-overs				Lethals			
					F ₁ mated to brother		to M-5 ♂	
	n	r ₁ *	r ₂	r ₃	n	% 1	n	% 1
a	—	—	—	—	332	8.1	86	7.0
b	187	0	0	0	53	24.5	40	10.0
c	898	0	0	2	194	8.3	195	3.7
d	558	5	6	8	134	10.4	116	6.9

* r₁ = second chromosome with 1 marker gene uncovered;

r₂ = second chromosome with 2 marker genes uncovered;

r₃ = second chromosome with 3 marker genes uncovered.

either to their brothers or to Muller-5 ♂♂. Consistently in all broods, the progeny of brother-sister matings contained a higher proportion of lethals. The Yanders effect can hardly have been responsible for this; for Muller-5 ♂♂ were used only when the supply of brothers was exhausted and this makes it unlikely that they should have been mated preferentially with the early hatching ♀♀ which, according to Yanders, may be supposed to have carried fewer lethals than the late hatching ones. A more probable explanation is that inbreeding resulted in homozygosity for either the second-chromosome markers or other recessive genes with effects on viability, and that this may have pushed a proportion of induced semi-lethals over the threshold into full lethality.

Subsequent experiments were done by a different scheme, outlined below. Pair matings were used, so that bunches of cross-overs could be detected.

P₁ Treated ♂♂ *y sc⁸ In 49 sc⁸*; $\frac{dp\ b\ cn\ bw}{++++} \times \text{♀♀} \frac{+}{+}; \frac{dp\ b\ cn\ bw}{dp\ b\ cn\ bw}$

F₁ (1) Scoring of cross-overs (both ♂♂ and ♀♀ are non-yellow)

(2) ♀♀ $\frac{y\ sc^8\ In\ 49\ sc^8}{+}$ mated individually to ♂♂ Or-K.

(3) Scoring of lethals as cultures without yellow ♂♂.

Three experiments were carried out by this technique, two on adult ♂♂ (MG 4 and MG 5) and one on pupae one day prior to eclosion (Mg 3, see Table 4). The results are shown in Table 6. In the experiments on adults, mating procedure had been changed: while the number of ♀♀ per ♂ per brood had remained unchanged at 3, the brood period for the first three broods had been reduced from

Table 6. *Sex-linked lethals and cross-overs in successive broods of treated ♂♂*

Expt.	Stage treated	Brood	Days	Cross-overs				Lethals	
				n	r ₁ *	r ₂	r ₃	n	% 1
MG 3	Pupae one day before eclosion	a	0—3	3147	1	1	2	650	3.8
		b	3—6	4088	36	21	16	622	6.9
		c	6—9	2371	22	18	10	318	11.9
		d	9—12	2909	3	1	0	461	3.5
MG 4	2—3 days after eclosion	a	0—2	5992	5	0	0	825	9.9
		b	2—4	4449	2	0	0	979	8.0
		c	4—6	3354	10	0	0	759	10.9
		d	6—9	2876	2	0	0	467	15.4
		e	9—12	2044	2	1	0	462	7.1
MG 5	2—3 days after eclosion	a	0—2	7197	2	0	0	610	5.9
		b	2—4	7414	1	0	0	607	4.6
		c	4—6	5155	7	1	1	730	9.5
		d	6—9	4432	5	0	0	736	10.7
		e	9—12	2484	2	9	3	430	3.7

* r₁, r₂, r₃ see Table 5.

3 to 2 days. This resulted in a shift of peak mutation frequency towards the fourth brood. F₁ flies with one second chromosome marker uncovered (r₁) occurred in all experiments; but since such flies may have been produced by deficiencies or mutations, they were not counted as cross-overs except where they formed the complementary class in a bunch in which some flies showed three of the marker genes (r₃). Using this criterion for crossing-over, it appears again that mustard gas is much less efficient than X-rays in producing crossing-over in adult ♂♂. Only one undoubted cross-over was found in MG 4, although mutation frequency reached a peak of 15.4%. In MG 5, with a peak mutation frequency of about 10%, crossing-over in brood *e* was about 0.5% (counting cross-overs within the same bunch separately). This is similar to the cross-over frequencies obtained by 2000 r of X-rays in experiments (AUERBACH 1954) in which the chromosome region covered by the markers was only one-fifth of that used in the present tests. After treatment of pupae, cross-overs were considerably more frequent, although mutation frequency was lower than in Expt. MG 4. Conditions in pupal germ cells seem to have favoured the induction of crossing-over compared with that of lethals.

For a location of the sensitive stage to mutagenesis only MG 3 and MG 5 can be used. In MG 3, the first clear cross-overs occurred before the peak of mutation frequency had been reached, and this is probably true also for MG 5, where mutation frequency in brood *c* was already near its peak and remained high in brood *d*. In agreement with what had been suggested by the brood pattern of pupae, this places the sensitive stage at or prior to meiosis. For a more accurate placing one has to take account of the occurrence and sizes of bunches of cross-overs. In Expt. MG 5, one large bunch — 2 *dpb* and 5 *cn bw* flies in a total of 14 — appeared in brood *e*; thus the germ cells represented in this brood must have included some early spermatogonia. These germ cells had not yet reached the sensitive stage, for mutation frequency in brood *e* was lower than in mature sperm. The arrangement of the much more frequent cross-overs in Expt. MG 3 into bunches is made difficult by the pronounced heterogeneity

of their distribution among the treated ♂♂. The majority of progenies contained no cross-overs; those that did, contained several, belonging to a variety of types. This makes it difficult to distinguish between a true bunch — tracing back to one cross-over event in a spermatogonial cell — and the coincidental occurrence in different spermatogonia of cross-overs in the same chromosome region. Thus, in brood *b* one ♂ not only had 2 *dp bw* and 2 *b cn* offspring, which may be interpreted as a bunch of four, but also 1 *dp b* and 1 *dp b cn* offspring, which must have arisen independently. In fact, it is quite possible that all cross-overs in brood *b* were singles if — following PARKER's (1948) hypothesis for X-ray induced crossing-over — it is assumed that in any one cyst of synchronously developing spermatocytes crossing-over is restricted to the same chromosome region. Even when every possible bunch in brood *b* is considered to be a true one, the affected spermatogonia cannot have been early ones: for the largest bunches formed only about 2% of the progeny in which they occurred, and every progeny contained two to three cross-over types that must have arisen separately. In brood *c*, all 28 cases of r_2 and r_3 occurred in 5 ♂♂, only one of which had produced cross-overs (of a different type) in previous broods. In one of these ♂♂ crossing-over appears to have occurred at a rather early stage of spermatogenesis: the 41 offspring of this ♂ included 5 *dp b cn*, which together with 5 *bw* may have formed a bunch of 10, 5 *dp bw*, 3 *dp* and 4 *cn* flies. In the remaining four ♂♂, cross-overs occurred singly or in small bunches of 2 or 3, and every progeny contained several independently arisen types; they must, therefore, have occurred in later spermatogonia. Thus, in Expt. MG 3 as in MG 5, mutation frequency was high in spermatocytes or very late spermatogonia and had its peak in somewhat earlier spermatogonia.

Discussion

The experiments presented here have shown that in the testis of *Drosophila* mustard gas produces its maximal mutagenic effect on late spermatogonia. X-rays, in contrast, are known to act preferentially on spermatids. This difference does not necessarily — or even plausibly — point to an essential difference in the action of these mutagens on the genetic material. Observed mutations are the final results of a chain of processes of which the interaction between mutagen and gene forms only one — although the most important — link. Mutation frequencies in different cell types may depend on conditions that favour or inhibit other links, such as the formation of mutagenically effective derivatives, or repair of labile premutations. Differences in sensitivity patterns to mutagens may be due to secondary effects on these cellular conditions. Even such closely related mutagens as X-rays and gamma-rays may give different sensitivity patterns; for in recent experiments by IVES (1960) gamma-rays from 500 r to 2500 r produced their maximal effect in spermatocytes.

In explanation of his results, IVES suggests that the sensitivity patterns of the pupal and imaginal testis to X-rays may not be the same; but the available evidence (AUERBACH 1954, KHISHIN 1955) rather suggests that they are. For mustard gas, a difference between pupal and imaginal sensitivity pattern cannot be excluded on the basis of our data (Table 6): but if it should exist, it could involve only a slight shift towards an earlier peak in pupae.

Experiments to test for the effects of storing on treated spermatozoa had to be carried out as a necessary preliminary to the brood pattern analysis, but their results are interesting in their own right through the bearing they have on the question of delayed mutation. As has been discussed fully elsewhere (AUERBACH 1951), the interpretation of delayed mutation after chemical treatment depends to a considerable extent on whether or not chromosome replication is required for the completion of potential mutations. The evidence available in 1951 suggested that it is not. Storing of treated spermatozoa had resulted in increased frequencies of large deletions and decreased proportions of fractionals among visibles (mainly *Minutes*); moreover, both effects were favoured by high temperature during storage. To this can now be added the result of two experiments in which storing had resulted in increased frequencies of *Minutes* and translocations respectively. For reasons discussed above and previously (1951), quantitative data on *Minutes* are unreliable, and to a lesser degree this applies also to large deletions. Yet, taken together these observations strongly suggest that no chromosome replication is required for the delayed production of intergenic changes by mustard gas.

The quantitatively much more reliable data on sex-linked lethals (Table 2) show that, on the contrary, no delayed point mutations occur in stored spermatozoa. These findings suggest a difference between delayed rearrangements and delayed gene mutations. Evidence that the latter occur at all is difficult to obtain and, so far, is somewhat slender. It rests on the observation of gonadic mosaics for fully viable visible and reverse mutations in the progeny of mustard gas treated ♂♂ (SOBELS 1960), and in particular on one pedigree in which gonadic mosaicism for a viable mutation to garnet occurred in F_1 and again in F_2 (AUERBACH 1950). In all these cases, gene replication may have occurred before delayed mutation. If, as the present data suggest, this should be generally true for delayed point mutations, the hypothesis (MCELMROY and SWANSON 1951, AUERBACH 1951) that chemically induced latent mutations are metastable gene configurations loses its main support.

HERSKOWITZ (1955, 1956) and SCHALET (1955) obtained results that at first sight seem similar to those discussed just now, but probably are essentially different from them. These workers treated spermatozoa inside the vagina of ♀ with either nitrogen mustard or TEM (tri-ethylene melamin) and scored translocations and sex-linked lethals in successive broods over a period of about two weeks. The frequency of translocations increased strikingly from brood to brood, that of lethals and chromosome losses remained sensibly the same. Since chromosome losses are presumed to be caused by chromosome breaks that fail to rejoin, the opening of potential breaks during storing cannot account for the increase in translocation frequency, although it may have contributed to it. An alternative interpretation takes account of the fact that nitrogen mustard and TEM are highly penetrating chemicals that can hardly fail to enter the ovaries when injected into the vagina. This was, in fact, proved to be so in one particular case (SCHALET 1956), where a translocation had been formed between a paternal and a maternal chromosome. While the other translocations involved only paternal chromosomes, the fact that they occurred in treated cytoplasm may well have affected their frequency. PATTERSON (1933) has shown

that irradiation of $\varphi\varphi$ increases the frequency with which an untreated paternal X-chromosome is lost during early cleavage. In some experiments by BONNIER (1954), irradiation of the $\varphi\varphi$ to which irradiated $\delta\delta$ were subsequently mated increased the frequency of mosaic rearrangements involving the paternal X-chromosome. It is, therefore, possible that the rejoining of broken chromosome ends may be facilitated in treated cytoplasm. This condition may take some time to establish itself, or it may be more readily induced in young oogonia than in oocytes. Indeed, when HERSKOWITZ (1957) repeated the experiment with X-rays, irradiating spermatozoa in inseminated $\varphi\varphi$, he found a similar, although less drastic, increase of translocation frequency in successive broods.

There have been several claims (FAHMY and FAHMY 1955, BATEMAN and CHANDLEY 1959) that the sensitivity pattern to the same mutagen may depend on the type of effect scored. BATEMAN and CHANDLEY, in a preliminary note on a very careful brood pattern analysis, state that after X-ray treatment the peak frequency of minute deficiencies occurs in younger germ cells than that of recessive lethals. Superficially, this is in agreement with one of our experiments (H 97, Table 1), in which lethals reached their peak frequency before *Minutes*. However, in the second experiment of this kind (H 92, Table 1) the sensitivity patterns for lethals and *Minutes* were identical. The difference in Expt. H 97 may have been due to all kinds of experimental imperfection: neglect of the Yanders effect; the mass mating procedure which, through insufficient opportunity for mating or egg-laying may have led to storing of spermatozoa in $\delta\delta$ or $\varphi\varphi$; differences between broods in culture conditions, resulting in different proportions of eclosed *Minutes*. It is thus not possible to conclude from our evidence that the sensitivity pattern to mustard gas is different for *Minutes* and sex-linked lethals.

For TEM as mutagen, FAHMY and FAHMY (1955) reached the opposite conclusion as did BATEMAN and CHANDLEY for X-rays. They report that after treatment with TEM *Minutes* have their highest frequency in mature sperm, while sex-linked lethals have it at an earlier stage, represented in the third brood. Since, however, the calculation of lethal frequencies in two of their experiments was based on chromosome samples ranging from 23 to 135, while in the third experiment the frequencies of neither lethals nor *Minutes* differed significantly between the first three broods, this conclusion seems hardly warranted. PURDOM (1957) could not confirm it for a different alkylating agent.

Experiments in which lethals and cross-overs were scored in the same progenies yielded estimates of the relative efficiencies with which mustard gas produces these effects. It appears that, compared with mutagenically equivalent doses of X-rays, mustard gas is relatively inefficient in the production of cross-overs in adult $\delta\delta$. This agrees with observations by SOBELS and his collaborators (SOBELS 1956, SOBELS and STEENIE 1957, SOBELS, BOOTSMAN and TATES 1959). Experiments carried out by this group showed that the abilities to induce mutations on the one hand, male crossing-over on the other may differ independently between mutagens. Thus, weakly mutagenic injections of formaldehyde or dihydroxy dimethyl peroxide were much more effective in producing cross-overs than highly mutagenic mustard gas treatment. Moreover, formaldehyde feeding of larvae, which is weakly — if at all — mutagenic for spermatogonia, produced

clusters of cross-overs in these cells. In our experiments with mustard gas, ♂♂ treated as pupae yielded more cross-overs for the same frequency of lethals than ♂♂ treated as imagines. Taken together, all these observations indicate that mutation and crossing-overs are produced in different ways, although it remains possible that the divergence may occur late along the paths connecting treatment and effect. A similar conclusion has been reached by LINNERT (1951, 1952) from a cytological study of chromosome rearrangements and chiasmata after chemical treatment of *Oenothera* and *Zea Mays*. She found that the production of rearrangements at pachytene by urethane is not preceded by non-homologous pairing, and that different chemicals show no correlation in their effects on chiasma frequency and on the formation of chromosome rearrangements. There is thus little ground for assuming either that induced crossing-over is a special case of interchange between broken chromosomes, or that rearrangements arise from non-homologous crossing over.

Finally, the results presented in Table 6 warrant brief discussion. They show that the frequency of sex-linked lethals may be markedly influenced by the type of ♂ to whom the F_1 ♀ is mated. With the particular mating scheme used, brother-sister mating gave consistently higher mutation frequencies than out-breeding. We have attributed this effect to homozygosity for autosomal recessives which, in conjunction with a detrimental gene on the treated X, gave a lethal effect. This is one of the possible explanations considered by HILDRETH and CARSON (1957) in explanation of their finding that the genotype of the P_1 ♀♀ affected the recovery of spontaneously arisen sex-linked lethals in wild-type ♂♂. Although, for various reasons, they do not favour this explanation, the isolated but striking observation reported here seems to support it.

Acknowledgement. Part of this investigation was carried out with the aid of a grant from the British Empire Cancer Campaign, for which grateful acknowledgement is given.

Summary

1. A comparison of brood patterns of mutation in pupae of different ages showed that the sensitive stage to mustard gas occurs prior to the sensitive stage to X-rays, and indicated that it occurs before meiosis. Simultaneous scoring of cross-overs and sex-linked lethals in ♂♂ treated as imagines or pupae confirmed this conclusion and attributed maximal sensitivity to late spermatogonia. Young spermatogonia are relatively insensitive; this was observed also in an experiment on autosomal lethals and cannot, therefore, be due solely to germinal selection.

2. Storing of treated spermatozoa in the treated ♂♂ themselves or in untreated ♀♀ increased the frequency of sex-linked lethals only slightly or not at all. The ascending part of the brood pattern is therefore not due to slow chemical reactions or delayed mutagenic effects, and the brood pattern can be taken to express real differences in sensitivity between germ cells.

3. Storing of spermatozoa increased the frequency of *Minutes* and may have increased that of translocations. It seems, therefore, that potential rearrangements, but not potential point mutations, can become realized during storing. The difference between this result and superficially similar ones obtained by other workers is discussed.

4. The brood patterns for *Minutes* and sex-linked lethals coincided in one experiment; in a second, *Minutes* reached peak frequency later than sex-linked lethals. This difference may have been due to distortion of the brood pattern by secondary causes.

5. Mustard gas produced fewer cross-overs in ♂♂ than would have been expected from mutagenically equivalent doses of X-rays. The ratio of cross-overs to lethals was higher in pupae than in imagines. These results, in conjunction with others obtained by various workers, indicate a difference in the mechanisms by which crossing-over and mutations are produced.

6. In one experiment, the type of ♂♂ to which the F_1 ♀♀ were mated, exercised a marked influence on the frequency of sex-linked lethals recovered in F_2 , brother-sister matings giving higher frequencies than outcrossing in all broods. This is attributed to the segregation of homozygous recessives, and a parallel is drawn between this result and somewhat similar ones obtained by HILDRETH and CARSON in a study of spontaneous mutation.

Literature cited

- AUERBACH, C.: Chemical induction of mutations. Proc. 8th Int., Congr. Genetics 1948. Hereditas (Lund.) Suppl., 128 (1949).
- AUERBACH, C.: Differences between effects of chemical and physical mutagens. Pubbl. Staz. zool. Napoli **22**, Suppl., 1 (1950).
- AUERBACH, C.: Problems in chemical mutagenesis. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **16**, 199 (1951).
- AUERBACH, C.: Sensitivity of *Drosophila* germ cells to mutagens. Heredity (Lund.) **6**, Suppl., 247 (1953).
- AUERBACH, C.: Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of X-rays. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **86**, 113 (1954).
- AUERBACH, C., and H. MOSER: An analysis of the mutagenic action of formaldehyde food. I. Sensitivity of *Drosophila* germ cells. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **85**, 479 (1953).
- BATEMAN, A. J., and A. C. CHANDLEY: Mutation spectrum of immature germ cells. *Drosophila* Information Service (DIS) **33**, 120 (1959).
- FAHMY, O. G., and M. J. FAHMY: Cytogenetic analysis of the action of carcinogens and tumor inhibitors in *Drosophila melanogaster*. IV. The cell stage during spermatogenesis and the induction of intra- and inter-genic mutations by 2:4:6-tri(ethyleneimino)-1:3:5-triazine. J. Genet. **53**, 563 (1955).
- HERSKOWITZ, I. H.: The incidence of chromosomal rearrangements and recessive lethal mutations following treatment of mature *Drosophila* sperm with 2:4:6-tri(ethyleneimino)-1:3:5-triazine. Genetics **40**, 574 (1955).
- HERSKOWITZ, I. H.: A relationship between translocation frequency and age at fertilization for sperm X-rayed in females of *Drosophila melanogaster*. Genetics **42**, 375 (1957).
- HILDRETH, P. E., and L. CARSON: Influence of the type of inseminated female on the lethal frequency in the X-chromosome from the male. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **43**, 175 (1957).
- IVES, P. T.: The effects of gamma-rays on fecundity and mutagenesis in Oregon-R males of *Drosophila*. Int. J. Radiol. Biol. **2**, 54 (1960).
- KAPLAN, W. D.: Factors influencing the frequency of mustard gas-induced dominant lethals in *Drosophila melanogaster*. Proc. 9th Int. Congr. Genetics 1953. Caryologia (Pisa) Suppl., 693 (1954).
- KHISHIN, A. E.: The response of the immature testis of *Drosophila* to the mutagenic action of X-rays. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 97 (1955).
- LINNERT, G.: Die Einwirkung von Chemikalien auf die Meiosis. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **83**, 422 (1951).

- LINNERT, G.: Der Einfluß von Chemikalien auf Chiasmenbildung und Mutationsauslösung bei *Oenothera*. *Chromosoma* (Berl.) **5**, 428 (1953).
- LÜNING, K. G.: X-ray induced mutations in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* (Lund.) **38**, 108 (1952).
- McELROY, W. D., and C. P. SWANSON: The theory of rate processes and gene mutation. *Quart. Rev. Biol.* **26**, 348 (1951).
- PARKER, D. R.: Observations on crossing-over induced by X-rays in the males of *Drosophila*. *Genetics* **33**, 304 (1948).
- PATTERSON, J. T.: The mechanism of mosaic formation in *Drosophila*. *Genetics* **18**, 32 (1933).
- PURDOM, C. E.: Comparative study of the effect of dose and cell stage on mutagenicity of different alkylating agents in *Drosophila melanogaster*. Ph. D. Thesis, London, p. 1—60, 1957.
- SCHALET, A.: The relationship between the frequency of nitrogen mustard induced translocations in mature sperm of *Drosophila* and utilization of sperm by females. *Genetics* **40**, 594 (1955).
- SCHALET, A.: A second case of translocation between paternal and maternal chromosomes. *Amer. Naturalist* **90**, 329 (1956).
- SOBELS, F. H.: Studies on the mutagenic action of formaldehyde in *Drosophila*. II. The production of mutations in females and the induction of crossing-over. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 743 (1956).
- SOBELS, F. H.: Rates of forward and reverse mutation induced by mustard gas in *Drosophila*. *Proc. 10th Int. Congr. Genetics*, 267 (1958).
- SOBELS, F. H., D. BOOTSMA and A. D. TATES (1959): The induction of crossing-over and lethal mutations by formaldehyde food in relation to stage specificity. *Drosophila Information Service* (DIS) **33**, 161 (1959).
- SOBELS, F. H., and H. VAN STEENIS: Chemical induction of crossing-over in *Drosophila* males. *Nature* (Lond.) **179**, 29 (1957).
- STRØMNAES, Ø.: The production of dominant lethals with X-rays in aged *Drosophila melanogaster* sperm. *Genetics* **34**, 462 (1949).
- VOGT, M.: Ergänzende Befunde zur mutagenen Wirkung der Urethane (Carbaminsäureester) bei *Drosophila*. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **83**, 341 (1950).
- YANDERS, A. F.: Relative time of eclosion of *Drosophila* females heterozygous for sex-linked recessive lethals. *Amer. Naturalist* **92**, 189 (1958).

DR. CHARLOTTE AUERBACH,

Institute of Animal Genetics, Kings Buildings, West Mains Road, Edinburgh/Schottland

Institute of Animal Genetics, Edinburgh

THE BROOD PATTERN FOR INTRAGENIC AND INTERGENIC CHANGES AFTER MUSTARD GAS TREATMENT OF DROSOPHILA ♂♂

By

E. M. SONBATI and C. AUERBACH

With 1 Figure in the Text

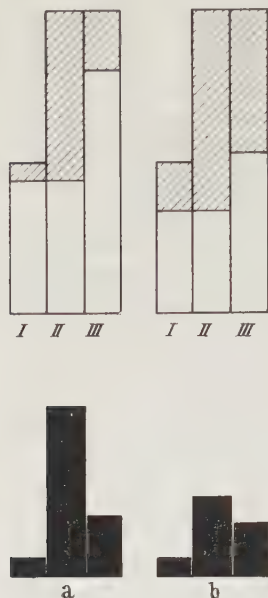
(Received June 18, 1960)

Many mutagens single out a particular stage of spermatogenesis for preferential or exclusive action. This stage is called the sensitive stage, and it is not the same for all mutagens. Knowledge of the causes of preferential sensitivity to specific mutagens might be a significant step forward in the analysis of induced mutagenesis, but so far it is not available for any mutagen. As a preliminary, it is important to decide whether the frequency of all mutagenic events, intragenic as well as intergenic, is stepped up during the sensitive stage or whether, as LUNING (1952) maintains for X-rays as mutagen, only intergenic changes are affected.

We decided to tackle problem for mustard gas as mutagen. The starting point for our approach were results obtained by NASRAT et al. (1954). These workers compared the frequencies of sex-linked lethals and translocations in mature spermatozoa after treatment with different doses of mustard gas. They found that with increasing dose the frequency of translocations increased as the square of the frequency of lethals. This agrees with the assumption that the majority of mustard gas induced lethals are due to single mutagenic events — point mutations and minute deficiencies — while a translocation requires two independent events, presumably chromosome breaks. Cytological observations (SLIZYNSKA and SLIZYNSKI 1947, SLIZYNSKA unpub.) do, in fact, show that mustard gas induced lethals include few large rearrangements.

The rationale of our experiment is illustrated in Fig. 1. In the diagrams above, Column I represents the frequency of sex-linked lethals in mature spermatozoa. A certain proportion of these lethals are large rearrangements. These have been shaded in. Two cases, differing in the proportion of rearrangements, are shown (Fig. 1a and 1b). In addition, some lethals will be due to small deficiencies. These have been disregarded in the diagram; they will, of course, have to be considered in the interpretation of the experimental data. In sensitive cells, the frequency of sex-linked lethals is about twice as high as in mature spermatozoa. It is represented by the height of Columns II and III, in which the shaded portion shows the proportion of rearrangements to be expected on the two hypotheses under test. In Column II it has been assumed that the frequency of point mutations is not changed in sensitive cells, and that the whole excess of lethals is made up of rearrangements. In Column III, it has been assumed that in sensitive cells all mutagenic events, point mutations as well as chromosome breaks, are favoured to the same extent. On this assumption, increased sensitivity is operationally equivalent to an increased dose of mustard

gas, and NASRAT's rule can be employed for partitioning the excess frequency of lethals into the contributions from point mutations and rearrangements; the latter increasing in frequency as the square of the former. Thus, in Fig. 1a an overall doubling of lethal frequency has been brought about by multiplying the initial frequency of point mutations which 1.8, and that of rearrangements with $(1.8)^2$; the corresponding factors in Fig. 1b are 1.7 and $(1.7)^2$. The lower part of Fig. 1 shows the frequencies of only the rearrangements. For the sake



of better comparison the initial frequency in Fig. 1b has been reduced to the same value as in Fig. 1a, and the expected frequencies in sensitive cells have been drawn to the same scale. Comparison between 1a and 1b shows that the values predicted by the two hypotheses differ the more, the lower the initial proportion of rearrangements among the lethals.

Lethal rearrangements are simply a particular type of two-break rearrangement. The frequencies of other types of rearrangement, e. g. translocations,

Fig. 1a and b. The frequencies of sex-linked lethals and rearrangements in mature spermatozoa and sensitive cells on two different assumptions and for two treatments producing different frequencies of position-effect lethals. Above: Sex-linked lethals (whole column) and position-effect lethals (shaded portion) I in mature spermatozoa, carrying few (1a) or many (1b) position-effect lethals, II in sensitive cells on the assumption that the whole excess over I is made up of intergenic changes, III in sensitive cells on the assumption that conditions in these cells favour the production of point mutations and chromosome breaks to the same extent. Below: The relative frequencies of large rearrangements in mature spermatozoa and sensitive cells on the same two assumptions. The frequencies in mature spermatozoa have been made equal in a and b, and those in sensitive cells have been drawn to the same scale

will vary in the same way between germ cells of different sensitivity. It should therefore be possible to distinguish between the two hypotheses by comparing the frequencies of lethals and translocations in mature sperm and sensitive cells. Since mustard gas induced lethals contain few rearrangements, a decisive answer can be obtained by a moderately-sized experiment.

Material and Methods

Treatment was given by exposing wild-type (Oregon-K, OrK) ♂♂ to air which had been passed through liquid mustard gas. The ♂♂ were 2—3 days old at the time of treatment. On the day following treatment they were mated to ♀♀ $Y^L, y In EN In 49, Y^S; bw; st$. Sex-linked lethals were scored in the progeny of F_1 ♀♀, and translocations in the progeny of F_1 ♂♂ backcrossed to $bw; st$ ♀♀. Interaction of the genes bw (brown) and st (scarlet) gives white eyes, so that apparent linkage between these genes by II—III translocations is easily scored. The X-chromosome of the P_1 ♀♀ (LINDSLEY and NOVITSKI 1959) carries two inversions, the marker gene y (yellow) and, attached in separate pieces to its ends, the entire Y-chromosome. F_1 ♂♂ therefore have two Y-chromosomes, a treated paternal and an untreated maternal one, and this will protect them against the sterility that is often produced by translocations with one breakpoint in the Y.

Matings were done in mass cultures of 20 ♂♂ and 30 ♀♀, and successive broods were obtained by re-mating the ♂♂ every 3 days to fresh ♀♀.

Results

The data are summarized in the Table. No translocations involving the Y-chromosome were obtained, and all figures refer to II—III translocations. A clear peak of mutation frequency was found in the third brood, which therefore can be taken to represent cells treated during the sensitive stage. There was no significant difference between the first two broods in the frequencies of either lethals ($\chi^2 = 0.8$) or translocations ($\chi^2 = 2.8$), and the data from these broods have therefore been combined into weighted averages: 4.2% lethals, 0.38% translocations. During the sensitive stage the frequency of lethals increased by a factor of $10.4/4.2 = 2.4$, that of translocations by a factor of $2.13/0.38 = 5.6$. Since $(2.4)^2 = 5.76$, translocation frequency increased as the square of lethal frequency, and the data are in excellent agreement with the assumption that in sensitive cells mutation and chromosome breakage are facilitated to the same degree.

Table. *Frequency of sex-linked lethals and II—III translocations in successive broods from treated ♂♂. Brood interval 3 days, mass cultures (20 ♂♂ : 30 ♀♀)*

Broods	Sex-linked lethals			Translocations		
	n	l	% l	n	t	% t
a	660	24	3.6	1410	2	0.14
b	1164	52	4.5	1482	9	0.61
c	830	85	10.2	796	17	2.13

χ^2 for (a + b) versus (c) (1 D.F.) = 32 for lethals, 25 for translocations.

The low translocation frequency in brood *a* makes the data obtained in this brood less reliable than those obtained in the other two broods. If one excludes this source of inaccuracy by restricting the comparison to broods *b* and *c*, agreement with expectation is less good; but the deviation from expectation is in the opposite direction from what would be expected on the alternative hypothesis, since translocation frequency increases less steeply than the square of lethal frequency. Another source of error is the fact that a small proportion of the lethals are themselves due to translocations or other two-break re-arrangements; but — as will be seen presently — correction for this does not materially affect the result.

Agreement with the alternative hypothesis is poor. Since calculation of the expected value requires several assumptions, only a rough estimate of the discrepancy between expectation and observation is possible. On the basis of cytological observations (SLIZYNSKA unpub.), the proportion of rearrangements among mustard gas induced lethals in mature spermatozoa has been estimated as 12%. The proportion of small deficiencies (up to 5 bands) was taken as 15% from a paper by SLIZYNSKA and SLIZYNSKI (1947); this is probably an overestimate, since in these early days lethals were collected indiscriminately over several broods, and many must have come from sensitive cells rather than mature sperm. Following LÜNING (1952), small deficiencies have been counted as intergenic changes, and it has been assumed that their frequency increases linearly with dose. This assumption is true for X-rays as mutagen; its validity for mustard gas finds some support in observations by FAHMY and BIRD (1953) on another alkylating agent, tri-ethylene melamine (TEM). With increasing doses of TEM, the frequency of lethals connected with large rearrangements increased

approximately as the square of the frequency of lethals that were free of gross structural changes but did contain 36% small deficiencies.

Using the assumptions listed above, the following calculations can be made:

Mature sperm $100 L = 12 LR + 15 SD + 73 PM$, where

L = total number of lethals,

LR = lethals connected with large rearrangements,

SD = lethals connected with small deficiencies,

PM = lethals caused by point mutations.

Sensitive stage (when the frequency of lethals was 2.4 times as high as in mature sperm)

$$240 L = 12 x^2 + 15 x + 73,$$

where x is the increase of minute deficiencies, x^2 that of large rearrangements. It can readily be found by trial and error that $x = 3.2$ gives a satisfactory fit, for $(3.2)^2 = 10.2$ and

$$(12 \times 10.2) LR + (15 \times 3.2) SD + 73 PM = 243 L.$$

Thus, translocation frequency in sensitive cells should be 10.2 times as high as in mature sperm; in actual fact, it was 5.6 times as high. The difference between expectation and observation is significant; for while the predicted percentage in sensitive cells in $0.38 \times 10.2 = 3.9$, the observed one was $2.1 \pm .5$.

It might be objected that the poor fit with the second hypothesis may have been caused by faulty estimates of the proportion of large rearrangements or small deficiencies among the lethals. If this were so, these same estimates should also give a poor fit with the first hypothesis; but, as the following calculation shows, this is not the case.

Mature sperm $100 L = 12 LR + 15 SD + 73 PM$.

Sensitive stage. Translocations in this stage were 5.6 times as frequent as in mature sperm; therefore LR , too, must have been 5.6 times as frequent. SD must have increased as the square root of 5.6, i. e. by a factor of 2.4. So, according to the first hypothesis, must have PM . Altogether, then, one expects the 100 lethals in mature sperm to have increased to

$$(12 \times 5.6) LR + (15 \times 2.4) SD + (73 \times 2.4) PM = 252.$$

Thus, the frequency of lethals in sensitive cells is expected to be 2.5 times as high as in mature sperm. Actually, it was 2.4 times as high.

Discussion

The results presented here are in good agreement with the assumption that conditions in sensitive cells favour point mutations and chromosome breakage to the same extent. They disagree with the assumption that only the frequency of intergenic changes is increased during the sensitive stage. This latter assumption has been put forward by LÜNING (1952) for X-rays as the mutagenic agent. While it is possible that mustard gas and X-rays may differ in this respect — especially in view of their difference in sensitivity pattern (AUERBACH and SONBATI, 1960) — convincing proof that this is so would be desirable. X-ray experiments by the method used here gave inconclusive results (AUERBACH 1955). The initial frequency of lethal rearrangements in irradiated sperm is already so high that a decisive result would require very large numbers of cultures (Fig. 1 b). Some support for the assumption that sensitivity to X-rays, too, involves both

mutation and chromosome breakage comes from the finding (OSTER 1957, FRITZ-NIGGLI 1958, SOBELS 1960) that degree of cellular oxygenation appears to play a major rôle in determining the sensitivity pattern to X-rays; for oxygen is known to enhance every type of X-ray effect.

When the present investigation was already completed, it was found that the sensitive stage to mustard gas occurs in premeiotic cells and not, like the sensitive stage to X-rays, in spermatids (AUERBACH and SONBATH, 1960). Provided that translocations are produced as readily in premeiotic as in postmeiotic cells, this finding should not affect the rationale and interpretation of our experiment; for the loss of half the premeiotically induced mutations is offset by the fact that a broken chromosome is twice as likely to encounter a second broken chromosome in a diploid as in a haploid cell. All the same, it is surprising that the predicted number of translocations did, in fact, take place; for conditions for the formation of translocations in premeiotic cells differ from those in postmeiotic ones and have been shown to be unfavourable to the production of translocations by X-rays. Our data indicate that this is not true for mustard gas. Two possible reasons for this come to mind. Firstly, most or all mustard gas induced breaks may remain latent until after meiosis so that, effectively, translocations are produced in postmeiotic cells. Secondly, the formation of translocations in spermatogonia may be more easily accomplished during mitosis (see MULLER 1954, p. 383 for a discussion of this point), and while a short exposure to X-rays will find most spermatogonia in interphase, mustard gas may remain active long enough for most spermatogonia to undergo mitosis during treatment. If this were true, other chemical mutagens, too, might be more effective than X-rays in the production of translocations before meiosis.

A striking feature of our experiment was the absence of translocations involving the Y-chromosome. HERSKOWITZ (1955) applied TEM to spermatozoa inside the genital tract of the ♀ and obtained 68 translocations between II and III, as against 25 between Y and II or Y and III, a ratio which is stated to resemble that obtained by X-raying spermatozoa inside the female receptacles. Our results clearly deviate from this ratio, which would have yielded about 10 translocations involving the Y in addition to the 28 observed II—III translocations. Nitrogen mustard, too, gave a deviating ratio in experiments by SCHALET (1955), but the deviation was in the opposite direction, 39 translocations involving the Y and 31 the two large autosomes. On the available evidence it is not possible to decide how far these differences between mutagens reflect real specificities, how far they are due to peculiarities of the strains used or to incidental experimental conditions.

Acknowledgement. This investigation was financed by a grant from the British Empire Cancer Campaign, which we acknowledge gratefully.

One of us (E.M.S.) also wishes to thank the Egyptian Government for financial aid during part of these investigations.

Summary

A comparison between the frequencies of lethals and translocations in successive broods agreed with the assumption that in sensitive cells all genetical effects of mustard gas, point mutations as well as chromosome breaks, are enhanced

to the same extent. The data disagreed with the assumption that only the frequency of intergenic changes is increased. Although the experiment was designed to detect translocations involving the Y-chromosome, no such translocations were obtained as against 28 translocations between the two large autosomes.

Since the sensitive stage to mustard gas occurs before meiosis, our data indicate that mustard gas — in contrast to X-rays — produced translocations as readily in late premeiotic as in postmeiotic cells. Possible reasons for this are discussed.

Literature cited

- AUERBACH, C.: The brood pattern of X-ray induced re-arrangements. *Drosophila Information Service (DIS)* **28**, 101 (1955).
- AUERBACH, C., and E. M. SONBATI: Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of mustard gas. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 237—252 (1960).
- FAHMY, O. G., and M. J. BIRD: Chromosome breaks among recessive lethals induced by chemical mutagens in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas (Lund)* **6** (Suppl.), 149 (1953).
- FRITZ-NIGGLI, H.: Different responses of diverse stages of spermatogenesis to changes in oxygen tension, chemical environment and quality of radiation. *Rad. Res.* **9**, 117 (1958).
- HERSKOWITZ, I. H.: The incidence of chromosomal rearrangements and recessive lethal mutations following treatment of mature *Drosophila* sperm with 2:4:6-tri(ethyleneimino)-1:3:5-triazine. *Genetics* **40**, 574 (1955).
- LINDSLEY, D. L., and E. NOVITSKI: Compound chromosomes involving the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **44**, 188 (1959).
- LÜNING, K. G.: Studies on the origin of apparent gene mutations in *Drosophila melanogaster*. *Acta zool.* **33**, 193 (1952).
- MULLER, H. J.: The manner of production of mutations by radiation. *Radiation Biology*, A. HOLLAENDER, edit., vol. I, chap. 7. 1954.
- NASRAT, G. E., W. D. KAPLAN and C. AUERBACH: A quantitative study of mustard gas induced chromosome breaks and re-arrangements in *Drosophila melanogaster*. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **86**, 249 (1954).
- OSTER, I. I.: Suggested mechanism underlying the differential radiosensitivity of cells having condensed chromosomes. *Genetics* **42**, 387 (1957).
- SCHALET, A.: The relationship between the frequency of nitrogen mustard induced translocations in mature sperm of *Drosophila* and utilization of sperm by females. *Genetics* **40**, 594 (1955).
- SLIZYNSKA, H., and B. M. SLIZYNSKI: Genetical and cytological studies of lethals induced by chemical treatment in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Roy. Soc. Edinb. B* **62**, 234 (1947).
- SOBELS, F. H.: Chemical steps involved in the production of mutations and chromosome aberrations by X-irradiation in *Drosophila* I. *Int. J. Rad. Biol.* **2**, 68 (1960).

Dr. CHARLOTTE AUERBACH,

Institute of Animal Genetics, Kings Buildings, West Mains Road, Edinburgh/Schottland

Botanisches Institut der Universität Köln; Abteilung für Mikrobiologie

THE INFLUENCE OF THE MULTIPLICITY OF INFECTION ON CROSSES WITH BACTERIOPHAGE T 1

By

THOMAS A. TRAUTNER

With 2 Figures in the Text

(Received June 14, 1960)

When recombination percentages are compared of identical T 1 crosses that had repeatedly been performed, considerable variations of these values have often been observed. As a result of experiments designed to inquire into the cause of these variations it was found that there existed for a given cross a relationship between the recombination percentage eventually to be observed and the multiplicity of infection of parental phages, an increase of multiplicity resulting in an increment of recombination percentages.

Materials and technique

Bacteria: *Escherichia coli* B, *E. coli* B/1, *Salmonella typhi* murium LT 2.

Phage: Different mutants of T1, as described by BRESCH and MENNIGMANN (1953). Mutants of phage P 22, kindly supplied by Dr. P. STARLINGER.

Liquid Media: Peptone (Merck) broth (1%) + 5 g NaCl/l adjusted to pH 7.3.

Platings: T1 crosses, as described by BRESCH and TRAUTNER (1956). P22 crosses as described by LEVINE (1957).

Crosses: Each T1 experiment consisted of simultaneously running several genetically identical crosses differing with respect to their multiplicities of infection. For this purpose aliquots of 0.1 ml. of bacteria grown to a titer of approximately 3×10^8 were simultaneously added to each of several tubes containing 0.4 ml. of a 1:1 mixture of parental phage in different dilutions. After three minutes at 37° C this adsorption mixture was diluted ten fold with broth. Because of lack of T1 anti serum, infected cells were separated from unadsorbed phage by centrifugation, which resulted in sedimentation of approximately 90 percent of the cells in the adsorption tube. Following the method described by HAUSMANN and BRESCH (1960) the sediment was washed several times with broth to further purify the cells from free phage. The bacteria were then resuspended in broth and after appropriate dilutions either distributed into several tubes for single burst analysis or allowed to lyse. Platings were made on B or on B + B/1.

In P22 crosses the adsorption time was 10 minutes. Here a potent antiserum was available to remove free phage from the adsorption mixture.

In some experiments premature lysis of infected cells was induced by diluting infected cells 1:10 into a suspension of 10^{10} UV inactivated T4 in M/100 NaCN, as described by DOERMANN (1952) and later also applied for T1 by BRESCH and TRAUTNER (1955).

Basic experiments

The results of 11 experiments of the 2 factor T1 cross *RmGe* \times ++ are shown in Fig. 1. As can be seen from the graph, with growing "infection titer" (IT), defined as titer of parental phage in the adsorption tube, there is to be observed an increase of recombination percentages up to a maximum, beyond which the recombination percentage decreases upon further increase of IT.

In a P22 cross $m_3h_{21} \times ++$ an increase of recombinants from 11–29% was observed, when the multiplicity of infection was raised from 5–25 particles.

Crosses with ITs lower than those indicated in Fig. 1 were not carried out, since lowering of ITs will lead to an increasing amount of singly infected cells for the progeny of which recombination values have to be corrected. Unambigu-

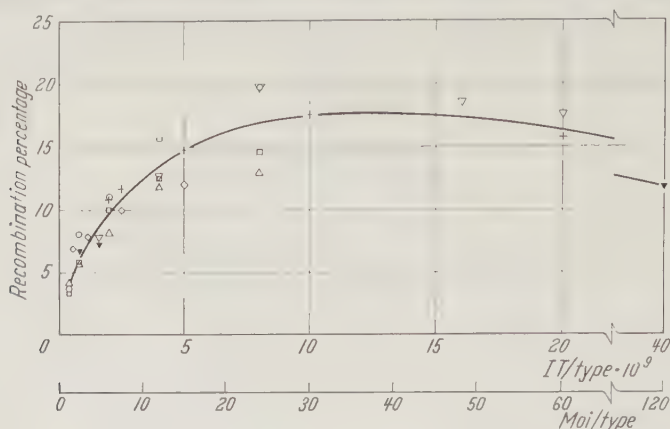
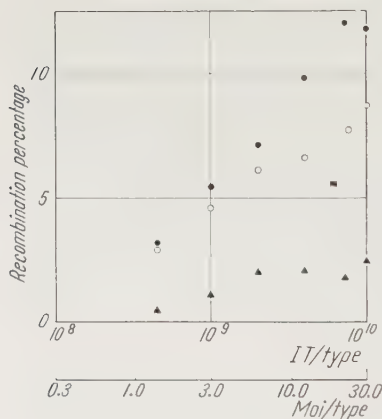


Fig. 1. Recombination percentages of two factor crosses $RmGe \times ++$ plotted against IT and MOI resp.

(Δ , \square , \circ , \diamond , \triangle) results from 5 crosses;
 (\blacktriangledown) represents values from single burst analysis from cross marked (Δ);
 (+) pooled values from single burst analysis of 6 crosses

ous results can only be obtained from analysis of mixed single bursts, which becomes increasingly tedious the further the infecting phages are diluted.



For several reasons also crosses with high ITs are technically difficult to perform: 1. Liberation of infected bacteria from free phage is not easily achieved at such ITs, which does also necessitate single burst analysis; 2. also the number of phage yielding bacteria decreases with an increment of ITs, probably due to some lysis from without

Fig. 2. Pooled recombination percentages from three factor crosses of type $RmGleHr \times +++$ (symbolized as 111×222) plotted against log IT and log MOI resp.

$$\begin{aligned}
 (\bullet) \quad & 12 \cdot + 21 \cdot \quad R_I, (\circ) \quad \cdot 12 \cdot + 21 \cdot = R_{II}, \\
 (\blacktriangle) \quad & \frac{121 + 212}{\dots} = R_{I, II}
 \end{aligned}$$

like phenomenon (DELBRÜCK 1940); 3. the bursts from the few bacteria yielding phage are smaller than bursts from cells infected with about 1–20 phage.

In spite of these difficulties a consideration of recombination values from such bursts showed a true decrease of recombination percentages to occur, when the IT is raised over a certain limit.

The multiplicity of a cross was determined following the time course of disappearance of free phage from a mixture of phage and bacteria in the presence

of chloramphenicol. In Fig. 1 the abscissa is divided into both measures of multiplicity, so that from this the transformation factor of IT into multiplicity of infection can be determined. With the knowledge of the multiplicity of infection corrections of the recombination percentages according to LENNOX, LEVINTHAL and SMITH (1953) can be made. But as can be seen from a comparison of recombination percentages from single burst and mass lysate crosses such a correction will not significantly influence the shape of the curve.

Besides the two factor crosses were also performed three factor crosses of the type T1 *RmGeHr* \times $+++$ the results of which are represented in Fig. 2, where the recombination percentage is plotted against the logarithm of the IT.

Interpretation

A. Increase of recombinant percentages with growing IT

As interpretations of the results in the following there are to be discussed four models. The validity of the first two could experimentally be decided upon.

1. The increase of recombination percentages might be due to differences in the lengths of the latent periods of crosses with different multiplicities, similar to lysis inhibition (DOERMANN 1948) in T4, where superinfection causes longer latent periods resulting in higher recombination percentages. This possibility could be excluded by determining recombination percentages from crosses, where cells infected with different ITs were prematurely lysed. The result of such an experiment is represented in the Table, from which it can be concluded that differences of the recombination values from crosses with different ITs do exist even early in the latent period, i. e. are not caused by progressively increasing lengths of latent period with increasing IT. The same conclusion could be reached from a comparison of one step growth curves. Such curves were found to be identical for multiplicities of 0.01, 5, and 10.

2. Some influence of unsynchronized adsorption might be responsible for the effect in the sense that the expression of a given recombination percentage might be due not to the absolute number of phage adsorbed, but rather to a spread in time of adsorption of a given number of particles. The identity, however, of recombination percentages from two crosses with adsorption times allowed inversely proportional to the ratio of their ITs — thus leading to cells infected with approximately identical numbers of phage showed that within the limits of adsorption times used in these experiments only the number of total phage adsorbed was responsible for the recombination value.

3. The third model is similar to model 2, since also here the increase of IT is thought to synchronize — independent of adsorption, however — the beginning of recombination. The model has first been suggested by STEINBERG (1958) in

Table. *Recombination percentages at various ITs at different times t (min) after infection*

IT t	$6.25 \cdot 10^8$	$1.25 \cdot 10^9$	$2.5 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^9$
10	2.8	3.4	4.5	5.0
11	3.5	4.1	—	5.5
12	3.2	5.7	5.5	7.0
13	4.7	4.9	8.0	—
17	4.7	6.9	9.2	10.8
after normal lysis	6.8	7.8	10.0	12.0

personal discussion and is based on results of CAIRNS (1957) who found that liberation of influenza virus progeny from infected cells occurs the more synchronized and the earlier the higher the multiplicity of infection was. Following such lines it is assumed that after infection any infecting structure is in some way fixed within the cell and thus at first excluded from multiplication and recombination. After having been fixed within this "waiting room" for some time, the particle may penetrate into the multiplication and recombination pool. With e. g. a constant probability given to each particle of the waiting room to enter this pool, the probability of the presence of heterologous particles in the pool and with that the probability of the production of recombinants in the pool will increase with an increment of multiplicity of infection.

On this model however there has to be imposed a condition which sheds some doubt on its validity: from the identity of one step growth curves of single and multiple infections and also from EDGAR'S (1958) finding, that double heterozygote infected cells produce large clones of recombinants and heterozygotes, it has to be followed that at least the first particle infecting a cell must not be fixed in the waiting room. Were it so, one would expect a much more pronounced spread of the onset of phage production in the case of single infection as compared to that of multiple infection.

4. With the favored model, although from the experiments presented not distinguishable from model 3, it is assumed that after penetration of phage DNA into the cell, some "area" is formed within which this particular phage multiplies. Upon infection of the cell with many phages there will be as many such areas and only in mixed areas of genetically different phage will effective, i. e. recombinant producing "cooperations"¹ occur. The higher the ITs the more frequent will such mixed areas appear. According to this model, recombination between two markers would not only depend on the marker distance but also on the ratio of mixed/(mixed + unmixed) areas. It should be understood that the term "areas" is only a description of the more general statement that a cell after infection is assumed not to be homogeneous with respect to the probabilities of vegetative particles to contribute genetic information to any cooperation. Only when the ratio mixed/(mixed + unmixed) equals unity, homogeneity of recombination probability is achieved.

The "topography" model can furthermore be specified by making assumptions as to whether the size of such areas is constant or expanding with time. This alternative could principally be decided upon by comparing premature lysis curves of crosses with different ITs. The unaccuracy, however, of such measurements does not allow to make any quantitative descriptions. Qualitatively, however, it seems likely that areas are expanding with time.

Although one could visualize other models to explain the results, several other findings of phage genetics can be interpreted by topography.

a) BRESCH (1955) in his investigations showing nonreciprocity of recombination in phage, observed a slight correlation in the appearance of any two of the six possible recombinants from a three factor cross. This is understandable from a consideration of topography which requires for recombination to occur the

¹ "Cooperation" is a term introduced by BRESCH (1959), very generally describing an event in a phage infected cell as a consequence of which a recombinant may arise. A special case of cooperation is a pairing ("mating") of two vegetative phage to produce a recombinant.

presence of a genetically mixed area, within which in spite of lack of reciprocal recombination all possible recombinants may arise with a certain probability.

b) The phenomenon of topography has also been discussed by HAUSMANN and BRESCH (1960) in connection with their experiments designed to decide between the alternative of pairwise or complete cooperations. Here a three parental-three factor-three allele cross of the type $121 \times 212 \times 322$ was performed and the ratio of the biparental to the triparental double recombinants determined (111:311-BD:TD). This ratio was found to be about 1.5, thus intermediate between the values calculated under the assumptions of either complete or pairwise cooperation, consequently giving no clear cut decision between the alternative originally posed. With complete or pairwise cooperation assumed to be the mechanism of recombinant formation this finding of a preponderance of BD over TD can very well be explained by topography, since biparental areas leading only to the production of BDs will preferentially be formed before triparental areas arise. The existence of topography is furthermore suggested from the finding that early in the latent period practically no TDs are found in contrast to a significant occurrence of BDs.

c) EDGAR's (1958) investigations of the progenies of T4 heterozygote infected cells can also be discussed in terms of topography. Working with r_{II} markers of T4 EDGAR was able to compare recombination values from cells which were infected with a double heterozygote $\frac{r_{IIA} + r_{IIB}}{+ r_{IIB}}$ with those that were mixedly infected with one phage each of types r_{IIA} and r_{IIB} respectively, their joint genetic information being identical to that of the heterozygote. It was found that the percentages of recombinants and heterozygotes from heterozygote infected cells were considerably higher than those from cells mixedly infected with a multiplicity of one of each parental phage. Although this result has been interpreted by EDGAR as evidence of the persistence of the heterozygote as such in the pool, and of recombination occurring preferentially as multiplication proceeds along the template of the heterozygote, it might as well be explained in terms of topography. Under the assumption that the heterozygote as such disappears with the first reduplication, such an infection would cause complete genetic mixing at the beginning of phage multiplication, thus explaining the high recombination percentages and also the large clone size of heterozygotes from such cells. A corroboration of this interpretation of EDGAR's data could perhaps be achieved by causing adsorption of parental phages to occur at most closely neighboring sites on the bacterial surface. To reach this condition it was tried to artificially make complexes of two or more phages by treating a mixture of genetically different P22 phages with diluted antiserum [HERSHEY and CHASE (1951)] and then infecting cells with them. Complexes of phage, however, occurred too seldom so that no more efforts were made along this line.

B. The decrease of recombination percentages

The condition of complete mixing could furthermore be imposed on a cell by raising the IT to some level of saturation with respect to recombination percentage. In contrast to expectation there was observed at this level of IT a decrease of recombination percentage, phage yielding cells, and of burst size. This phenomenon is thought not to be due to some inconsistency of our model, but rather

the kinetics of topography are assumed to be superimposed by secondary effects. E. g. the high number of phage adsorbed might cause some cells to be disturbed in their cellular integrity and thus be hindered from normal phage production. As another possibility one might think of a disturbance of the equilibrium between the processes of phage maturation and DNA multiplication necessary for normal yields, in the sense that maturation has become so rapid in highly infected cells that phage are matured and the cells lysed before much recombination could take place.

Conclusions

The existence of topography has several implications for the interpretation of experiments in phage genetics.

1. It has to be followed that one of the assumptions leading to the formulation of the population genetics (VISCONTI and DELBRÜCK 1953; BRESCH and STARLINGER 1958; BRESCH 1959) is oversimplified, namely that the probability of a particle to contribute to a cooperation is only a function of its relative frequency in the vegetative pool. This condition is only realized in mixed areas. Irrespective of the requirement to correct the population genetics for the effects of topography, for practical reasons one is running into another difficulty: What recombination value is one going to attribute to a given cross? Theoretically one may consider two limiting recombination percentages:

a) A possibly lowest recombination percentage which will be established in a cell infected with only one of each of the parental phages. This recombination percentage will remain constant upon further lowering of ITs, when only yields of mixedly infected cells are considered. In cases of complementation as with the infection of a K 12 (λ) cell with one phage $T4r_{IIA}$ and another $T4r_{IIB}$ this recombination percentage can readily be determined, since only the cells infected with the two parental types will produce progeny (EPSTEIN 1958).

b) A theoretically maximal recombination percentage will be found, when from the onset of phage multiplication effective recombinations can occur. This situation may be achieved by single infections of a cell with a double heterozygote for an r marker of each the A and B cistrons. The progeny of cells infected in this way can also be selected for.

The applicability, however, of the methods of determination is restricted to T4. Thus it must be followed that at least for such phage systems which show the effect of topography, a determination and description of a recombination percentage has to be paralleled by an indication of the multiplicity of infection at which this particular cross was run. As a standard multiplicity one should choose the one at which the recombination percentage is at a maximum and at which the secondary effects described under "decrease" are minimal.

Zusammenfassung

Bei Kreuzung mit dem Bakteriophagen T1 wurde eine Abhängigkeit des Rekombinantenprozentsatzes von der Infektionszahl beobachtet. Der Rekombinantenprozentsatz einer gegebenen Kreuzung steigt mit zunehmender Infektionszahl auf einen Maximalwert an, um bei weiterer Erhöhung wiederum abzunehmen. Zur Interpretation des Anstieges wird eine „Topographie“ in der infizierten Zelle angenommen; danach erfolgt die Vermehrung jedes infizierenden

Phagen in einem eigenen Vermehrungsareal. Zur Bildung von genetischen Rekombinanten kann es erst dann kommen, wenn sich derartige Areale genetisch verschiedener Phagen durchdringen. Dieses wird um so häufiger und um so früher in der Latenzperiode erfolgen, je höher die Infektionszahl ist. Das vorgeschlagene Modell wird im Lichte der Populationsgenetik von Bakteriophagen und anderer experimenteller Ergebnisse diskutiert.

Acknowledgements. The author is deeply indebted to Prof. C. BRESCH for many essential discussions and contributions, furthermore to Prof. A. H. DOERMANN, Dr. P. STARLINGER, Dr. R. HAUSMANN and C. STEINBERG. The technical assistance of S. BOEHNER, and H. MODERSOHN is appreciated.

Part of the work reported was performed while the author held a stipend of the "Deutsche Forschungsgemeinschaft", this and also the support given to Prof. BRESCH by this institution is greatly acknowledged.

Anmerkung bei der Korrektur: Der Einfluß des Infektionstiters auf den Rekombinanten-Prozentsatz wurde inzwischen auch von DOERMANN und MOSIG am Phagen T 4 beobachtet. Jedoch wirkt sich dort die Zahl der adsorbierten Phagen nur in dem Bereich bis zu etwa 5 Partikel/Zelle aus. Adsorption von weiteren Phagen führt zu keiner zusätzlichen Steigerung der Rekombinantenhäufigkeit. (Persönliche Mitteilung.)

Literature

- BRESCH, C.: Zum Paarungsmechanismus von Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **10b**, 545—561 (1955).
- BRESCH, C.: Recombination in bacteriophage. *Ann. Rev. Microbiol.* **13**, 133—334 (1959).
- BRESCH, C., u. H. D. MENNIGMANN: Weitere Untersuchungen zur Genetik von T 1 Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **9b**, 212—215 (1954).
- BRESCH, C., u. P. STARLINGER: Zum Problem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 459—468 (1958).
- BRESCH, C., u. T. TRAUTNER: Zur Kinetik der Rekombinantenbildung bei T1 Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **10b**, 436—440 (1955).
- BRESCH, C., u. T. TRAUTNER: Die Bedeutung des Zweifarbnährbodens für genetische Untersuchungen am Bakteriophagen T1. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 590—594 (1956).
- CAIRNS, H. J. F.: The asynchrony of infection by influenza virus. *Virology* **3**, 1—21 (1957).
- DELBRÜCK, M.: The growth of bacteriophage and lysis of the host. *J. gen. Physiol.* **23**, 643—660 (1940).
- DOERMANN, A. H.: Lysis and lysis inhibition with *E. coli* bacteriophage. *J. Bact.* **55**, 257 (1948).
- DOERMANN, A. H.: The intracellular growth of bacteriophages. I. *J. gen. Physiol.* **35**, 645 (1952).
- EDGAR, R.: High negative interference and heterozygosis: A study on the mechanism of recombination in bacteriophage T4. (1958) manuscript in preparation.
- EPSTEIN, R. H.: A study of multiplicity reactivation in the bacteriophage T4. *Virology* **6**, 22—41 (1957).
- HAUSMANN, R., u. C. BRESCH: Zum Problem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. II. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 266—276 (1960).
- HERSHEY, A. D., and M. CHASE: Genetic recombination and heterozygosis in bacteriophage. *Cold. Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **16**, 471—479 (1951).
- LENNOX, E. S., C. LEVINthal and F. SMITH: The effect of finite input in reducing recombinant frequency. *Genetics* **34**, 588 (1953).
- LEVINE, M.: Mutations in the temperate phage P22 and lysogeny in *Salmonella*. *Virology* **3**, 22—41 (1957).
- VISCONTI, N., and M. DELBRÜCK: The mechanism of genetic recombination in phage. *Genetics* **38**, 5—33 (1953).

THOMAS A. TRAUTNER, Botanisches Institut der Universität Köln,
Abteilung für Mikrobiologie, Köln-Lindenthal/Rhein, Gyrhofstr. 15

Aus der Abteilung für Mikrobiologie, Botanisches Institut der Universität zu Köln

ZUM PROBLEM DER GENETISCHEN REKOMBINATION VON BAKTERIOPHAGEN

II. VERSUCH EINER EXPERIMENTELLEN UNTERSCHIEDUNG VON PAARWEISER UND KOMPLETTER KOOPERATION

Von

RUDOLF HAUSMANN und CARSTEN BRESCH

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 14. Juni 1960)

Bei einer Kreuzung von Bakteriophagen beobachtet man im Laufe der Latenzperiode die Entstehung von Rekombinanten, d. h. von Partikeln, deren genetische Information von verschiedenen Elternstrukturen hergeleitet wurde. Der Mechanismus einer derartigen Rekombination ist im Grunde noch unbekannt. Ein Teilproblem für die Aufklärung dieses Prozesses bildet die Frage, ob die genetische Struktur eines neuen Rekombinantenpartikels unter der kooperativen Kontrolle von zwei und immer von höchstens zwei Erzeugerstrukturen entsteht, oder ob bei ihrer Bildung auch mehr als zwei Informationsquellen kooperieren können.

Betrachtet man die Doppelrekombinanten einer 3 Faktor-Kreuzung 111×222 , so besteht die gesamte genetische Information eines solchen Partikels aus drei Abschnitten, die durch die beiden Rekombinationsstellen [„switches of information source“ (HERSHEY 1958)] getrennt werden. Wenn dabei zwangsläufig die beiden Außenabschnitte immer von der gleichen individuellen Erzeugerstruktur gebildet werden, so ist die Rekombinantenentstehung ein Prozeß von paarweiser Kooperation. Sind dagegen die drei Abschnitte immer von drei zufälligen, d. h. zumeist von drei individuell verschiedenen Erzeugerstrukturen des Pools geliefert worden, so wird der Prozeß als komplette Kooperation bezeichnet. Schließlich entstünden die Rekombinanten aus inkompletter Kooperation, wenn zwar prinzipiell die Beteiligung von drei individuell verschiedenen Erzeugerstrukturen möglich ist, jedoch eine überzufallsgroße Wahrscheinlichkeit für die Doppelbeteiligung einer Struktur besteht.

Die mathematische Analyse dieses populationsgenetischen Problems wurde in einer vorangehenden Arbeit (BRESCH und STARLINGER 1958) behandelt. Diese Publikation bildet die theoretische Basis für die Interpretation der in dieser Arbeit zu beschreibenden Versuchsergebnisse. Die allgemeinen logischen Grundlagen der Populationsgenetik von Bakteriophagen wurden ebenfalls kürzlich von BRESCH (1959) zusammengefaßt. Dort ist auch die tiefere Bedeutung aller in der mathematischen Darstellung auftretenden Parameter ausführlich dargestellt. Der im folgenden zu untersuchende Charakter der Kooperation wird durch einen Parameter Q , den sog. Kooperationsgrad, beschrieben, der für paarweise Kooperation den Wert $Q = 2$, für komplette Kooperation $Q = 1$ und für inkomplette Kooperation $1 < Q < 2$ hat. Wie aus BRESCH (1959) ersichtlich, bildet Q mit

M_{PI} , M_{PII} und C_M die Vierergruppe von unabhängigen Kreuzungskonstanten, die das Rekombinationsverhalten einer bestimmten 3 Faktor-Kreuzung vollständig beschreiben. Die Gewinnung von Q ist prinzipiell aus 2 Faktor- oder symmetrischen 3 Faktor-Kreuzungen nicht möglich. Jedoch könnte eine Unterscheidung von paarweiser und kompletter Kooperation unter anderem durch eine 3 Eltern- 3 Faktor- 3 Allel-Kreuzung mit gekoppelten Genen und symmetrischer Infektion

$$121 \times 212 \times 322$$

erfolgen. Eine derartige Kreuzung ist schematisch in Abb. 1 dargestellt:

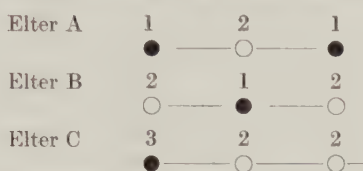


Abb. 1. Schema einer 3 Eltern- 3 Faktor- 3 Allel-Kreuzung

Im Falle von *kompletter* Kooperation ist die Bildung der biparentalen Doppelrekombinante (BD) vom Typ 111 ebenso wahrscheinlich, wie die der triparentalen Doppelrekombinante (TD) vom Typ 311, denn beide können durch nur eine Kooperation entstehen. Unter den Nachkommenphagen ist daher ein Verhältnis $BD/TD = 1$ zu erwarten. Im Gegensatz dazu können bei Annahme eines *paarweisen* Prozesses zwar BD in einer Kooperation, TD aber nur in zwei konsekutiven Kooperationen gebildet werden. Das Verhältnis BD/TD nimmt daher einen Wert größer als 1 an, der aus den Kreuzungskonstanten des Gen-Triplets zu berechnen ist.

Material und Technik

Stämme. Bakterien: *E. coli* B als Wirt und eine 2:1-Mischung von B und B/1 als Indikator. Bakteriophagen: die bereits von BRESCH und MENNIGMANN (1954) benutzten T1-Mutanten *Ge*, *Hr* und *Fk* sowie ein bisher nicht beschriebenes Allel des *Ge* locus (Bezeichnung *Gb*), das sich von *Ge* durch einen zusätzlichen blauen Ring um den gelben Hof unterscheidet. Die Kopplungsgruppe der beteiligten Gene zeigt Abb. 2.

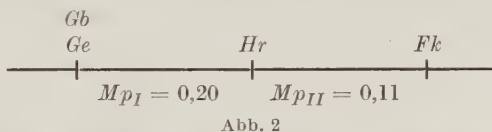


Abb. 2

Nährmedien. Flüssige Kulturen in Peptonwasser; Agar-Nährböden wie bei BRESCH und TRAUTNER (1956) beschrieben.

Kreuzungen. Wachsende Bakterienkulturen werden durch Zentrifugation angereichert, im Phasenkontrastmikroskop gezählt, dann in einem solchen Verhältnis zu einer Mischung der Phagenlysate gegeben, daß die Endtiter im Adsorptionsröhrchen für Bakterien etwa $2 \cdot 10^8$ und für Phagen (gesamt) $6-12 \cdot 10^9$ betragen. Nach 3,5 min bei 37°C sind 9 bis 18 Phagen/Zelle adsorbiert (Berechnung aus Einzelwurfdaten). Die Adsorptionsmischung wird 1:10 in Peptonwasser von 20°C verdünnt, dann zentrifugiert und das Sediment mehrmals abgespült, wobei mehr als 99,5% aller freien Phagen entfernt werden. Anschließend wird das Sediment in frischem Medium (20°C) aufgenommen, und die darin enthaltenen Bakterien

teils (a) zur *vorreifen Lyse* gebracht. Entsprechend der Technik von DOERMANN (1952) werden 0,1 ml Bakteriensuspension in 0,9 ml einer Lysismischung (10^{-2} mol NaCN und

etwa $2 \cdot 10^{10}$ UV-inaktivierte T4-Phagen in Peptonwasser) gegeben, dann nach 45 min bei 20°C passend weiter verdünnt und plattiert,

teils (b) in Einzelwurf-Technik nach einer Stunde bei 37°C ausplattiert (etwa 200 Platten), um den Prozentsatz der von drei verschiedenen Elterntypen infizierten Bakterien zu bestimmen. Seltene Versuche mit weniger als 80% 3-Eltern-infizierten Wirtszellen wurden verworfen,

teils (c) zur Erhaltung der eigentlichen Statistik nach weiterer passender Verdünnung etwa 2 Std bei 37°C bebrütet und als *Massenlysate* plattiert. Die gesuchten BD- und TD-Typen wurden auf all diesen Platten ausgezählt, während die Elterntypen und die übrigen Rekombinanten nur auf einem Teil der Platten gezählt und dann mit dem entsprechenden Faktor multipliziert wurden.

V Versuchsergebnisse

I. 2 Eltern-Kreuzungen $Ge \times Gb$ zur Prüfung der Allelie

Resultat. Unter etwa 2×4000 Parentaltypen traten keine Rekombinanten auf. Dieses Ergebnis schließt nicht die Möglichkeit seltener Rekombination aus, es zeigt jedoch, daß die Genabstände $Ge-Hr$ und $Gb-Hr$ als annähernd gleich angesehen werden können.

II. 2 Eltern-Kreuzungen $GeHrFk \times +++$ zur Bestimmung der Kreuzungskonstanten des benutzten Gen-Triplets

Drei Versuche bei einem Infektionstiter von etwa $5 \cdot 10^9$ je Typ gaben unter insgesamt 14000 Nachkommen folgende Mittelwerte: 8,09% Austausch für Ge , 1,12% für Hr und 4,09% für Fk . Daraus berechnen sich ohne Berücksichtigung der Reifung (vgl. BRESCH 1959) Werte von $M_{pI} = 0,204$, $M_{pII} = 0,110$ und $M_{pIpII}CQ = 0,033$.

III. 3 Eltern- 3 Faktor- 3 Allel-Kreuzungen

Es wurden 4 verschiedene Kreuzungen je zweimal ausgeführt					Hierin waren die kritischen Typen	
A	\times	B	\times	C	BD	TD
α : +++	\times	$GeHrFk$	\times	$Gb + Fk$	+ Hr +	$GbHr$ +
β : $Gb + +$	\times	$GeHrFk$	\times	$+++ Fk$	$GbHr$ +	+ Hr +
γ : $GbHr +$	\times	$+++ Fk$	\times	$GeHrFk$	$Gb + +$	$Ge + +$
δ : $GeHr +$	\times	$+++ Fk$	\times	$GbHrFk$	$Ge + +$	$Gb + +$

Von jeder Kreuzung wurde außer der normalen Lyse noch eine vorreife Lyse, im Versuch δ_2 noch 4 vorreife Lysen, untersucht. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse aller Versuche wiedergegeben. Eine kritische Betrachtung dieser Daten offenbart zwei technische Mängel:

1. Es besteht in allen Kreuzungen eine starke Diskrepanz zwischen dem „neutralen“ Elter B einerseits und den beiden „kritischen“ Eltern A und C andererseits. Dieser Unterschied resultiert vermutlich aus dem Hr -Gen, denn in den Kreuzungen α und β liegt der B Elter bei der vorreifen Lyse zurück, während er bei normaler Lyse die A- und C-Eltern überflügelt, wogegen das Umgekehrte bei den Kreuzungen γ und δ beobachtet wird. Diesen Befund könnte die Annahme deuten, daß die Reifungswahrscheinlichkeit von vegetativen Hr -Partikeln kleiner ist als die der Hr^+ tragenden Partikel. Dadurch verbleiben

Tabelle

Kreuzung	% 3 Eltern infizierte Bakterien	Eltern-verhältnis A : B : C für Adsorption	Lyse	Nachkommenschaft						
				Eltern			Summe aller Re- kombi- nanten (%)	BD	TD	BD TD
				A	B	C				
α_1	> 95	1:1:1	{ normal vorreif	42000	91000	41000	13,7	52	31	1,68
				70000	15000	75000	3,0	21	5	4,2
α_2	88	1:1,2:1,1	{ normal vorreif	19000	21000	19000	10,5	48	28	1,71
				64000	34000	67000	7,1	60	39	1,54
β_1	> 95	1:1:1	{ normal vorreif	16000	36000	17000	10,7	53	35	1,51
				97000	22000	95000	1,14	16	0	„∞“
β_2	92	1:0,9:0,8	{ normal vorreif	16000	16000	15000	12,3	62	32	1,94
				80000	38000	74000	5,0	57	31	1,84
γ_1	85	1:1,6:1	{ normal vorreif	9500	22000	6800	10,3	130	71	1,83
				21000	199000	13000	1,07	29	4	7,3
γ_2	86	1:0,8:1	{ normal vorreif	12000	13000	11000	10,1	42	20	2,10
				29000	37000	16000	6,9	40	16	2,5
δ_1	90	1:1:1	{ normal vorreif	26000	27000	27000	9,0	144	97	1,49
				28000	233000	45000	1,6	30	2	15
δ_2	95	1:3:1	{ normal vorreif vorreif vorreif vorreif vorreif	14000	21000	18000	9,6	61	46	1,33
				24000	81000	41000	4,7	42	14	3,0
				26000	28000	52000	4,0	46	19	2,4
				39000	217000	75000	2,7	31	11	2,8
				36000	287000	70000	2,1	32	6	5,3

die *Hr*-Typen länger im Pool und können sich weiter vermehren, was schließlich zu einer Überkompensation ihrer anfänglichen Unterlegenheit führt.

Das Verhältnis der kritischen BD- und TD-Typen wird jedoch hiervon nicht entscheidend berührt, da in allen Kreuzungen befriedigende Symmetrie für den A- und C-Elter besteht. Dagegen sind alle Angaben von Rekombinantenprozent-sätzen in der Tabelle mit dieser *Hr*/*Hr*⁻-Asymmetrie behaftet und dürfen nur für qualitative Schlüsse herangezogen werden.

2. Weiter mußten wegen der schlechten Adsorption des Phagen T1 und des Fehlens eines geeigneten Antiserums die Bakterien nach Infektion abzentrifugiert und gewaschen werden. Hierbei wurde Zimmertemperatur eingehalten, um durch eine Verlängerung der Latenzperiode einerseits die Anlage der Einzelwurf-Röhrchen und andererseits die Untersuchung vorreifer Lysen zu ermöglichen. Wahrscheinlich gelang es wegen dieser Temperaturverhältnisse, in einigen vorreifen Lysen (die in verschiedenen Experimenten zu verschiedenen Zeiten angelegt wurden) bis in die ersten Anfänge der Rekombinationsereignisse zurückzugehen, so daß nur etwa 1% Rekombinanten (Summe aller Typen) gefunden wurde gegen etwa 12% bei normaler Lyse. In früheren ähnlichen Versuchen an T4 (DOERMANN 1953) und an T1 (BRESCH und TRAUTNER 1955) zeigten die ersten gereiften Partikel bereits ein Drittel bis die Hälfte des bei normaler Lyse gefundenen Rekombinantenprozentsatzes.

Diese beiden Mängel, die Reifungsasymmetrie von *Hr* und *Hr*⁺ und der späte Beginn der Rekombination, traten weder in früheren Versuchen auf, noch bei den 2 Faktor-Kontrollkreuzungen zur Bestimmung der Kreuzungskonstanten.

Sie sind vermutlich beide auf die niedrigen Versuchstemperaturen in den 3 Allel-Kreuzungen zurückzuführen.

Die in der Tabelle angegebenen BD:TD-Verhältnisse bedürfen noch einer Korrektur. Aus folgenden Gründen nämlich würden selbst bei kompletter Kooperation mehr BD als TD gebildet:

a) Es gibt wenige, nur mit 2 Eltern (A und B) infizierte Zellen. In ihnen können zwar BD, nicht aber TD entstehen.

b) In 3 Eltern infizierten Zellen gehorcht das Verhältnis der adsorbierten Eltern einer zufallsstatistischen Verteilung. Während nun die Bildung der TD proportional dem Produkt der Anteile der 3 Eltern

$$[A] \cdot [B] \cdot [C]$$

ist, entstehen bei kompletter Kooperation alle — bei paarweiser Kooperation die in zwei konsekutiven Paarungen gebildeten BD proportional mit dem Produkt

$$[A]^2 \cdot [B].$$

Werden die beiden kritischen Eltern A und C im Mittel in gleichen Häufigkeiten adsorbiert, so ergibt sich insgesamt ein Vorteil der BD, da in Bakterien mit zufallsstatistischer A-Überlegenheit diese sich stärker zugunsten der BD auswirkt, als die gleiche zufallsstatistische C-Überlegenheit in anderen Zellen zugunsten der TD.

c) In gleicher Richtung wird sich auch eine Streuung in der zeitlichen Folge der Infektion des Bakteriums durch die einzelnen Elterntypen auswirken (3,5 min Adsorptionszeit). Das heißt, wird eine Zelle frühzeitig von A und B infiziert und erst etwas später von C, so können die ersten beiden Eltern bereits BD-Rekombinanten erzeugen. Der statistisch

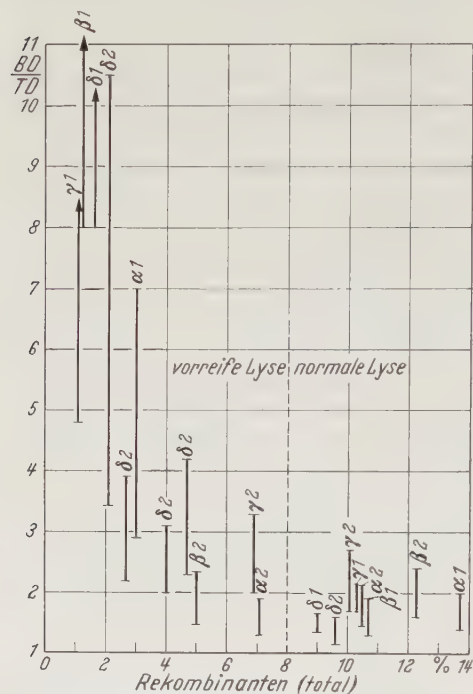


Abb. 3. Summarische Darstellung der unkorrigierten Versuchsergebnisse. Das BD/TD-Verhältnis ist als Funktion des Rekombinantenprozentsatzes aufgetragen. Jeder Versuch entspricht einer Strichmarkierung, die zugleich die statistisch bedingte Genauigkeit des Versuches charakterisiert

ebenso häufige Fall der frühen Adsorption von B und C und der späteren Infektion durch A kann dagegen vor dem Hinzukommen der A-Eltern noch nicht zur Bildung von TD führen.

Die durch ungleichzeitige Adsorption und durch die dadurch ermöglichte frühere Reduplikation verschobenen Anteile der einzelnen Eltern an der Gesamtpopulation wirken sich wie bei (b) ebenfalls zugunsten der BD aus.

Eine vorsichtige Abschätzung der erforderlichen Korrekturen des BD:TD-Verhältnisses [die der von LENNOX, LEVINTHAL und SMITH (1953) angegebenen Korrektur von Rekombinantenprozentsätzen entspricht] führt zu einer Reduk-

tion des BD:TD-Verhältnisses um 5—15%, je nach der in der jeweiligen Kreuzung gemessenen Infektionszahl. Insgesamt erhält man aus allen Kreuzungen einen mittleren BD:TD-Wert von etwa 1,5.

Obwohl die Experimente nicht in der Absicht durchgeführt wurden, systematisch den Verlauf des BD:TD-Verhältnisses während der Latenzperiode zu bestimmen, sondern lediglich die Konstanz des BD:TD-Wertes an Hand einzelner Vergleichsmessungen geprüft werden sollte, zeigt die in Abb. 3 wiedergegebene graphische Gesamtdarstellung der Ergebnisse trotz der Hr/Hr^+ Asymmetrie eine recht gute Übereinstimmung der Daten aus acht verschiedenen Versuchen. Die BD:TD-Verhältnisse wurden hierbei (unkorrigiert) gegen den Prozentsatz der Summe aller Rekombinanten aufgetragen. In Ermangelung eines linearen Zeitmaßes gibt dieser Prozentsatz offenbar noch ein gutes Maß für das Fortschreiten der Rekombinationsakte im Pool.

Wenn man auch auf Grund des bereits erwähnten späten Beginns der Rekombination und der Reifungsunterschiede für Hr und Hr^+ aus den beschriebenen Versuchen keine wirklich quantitativen Schlüsse ziehen kann, so können bei aller Vorsicht insgesamt doch zwei Befunde als experimentell gesichert angesehen werden:

1. In frühen Phasen der Latenzperiode werden erheblich mehr BD als TD gebildet.
2. Zu Ende der Latenzperiode aber werden höchstens 50% mehr BD als TD produziert.

Dieses Ergebnis ist nicht durch selektive Vor- oder Nachteile der kritischen Typen oder deren Erzeugerstrukturen vorgetäuscht, da es in vier äquivalenten Kreuzungen beobachtet werden kann.

Diskussion

I. Paarweise Kooperation

Der zeitliche Verlauf des BD/TD-Verhältnisses scheint auf den ersten Blick die gestellte Frage eindeutig zugunsten der paarweisen Kooperation zu entscheiden. Wir können jedoch aus der quantitativ auswertbaren Kontroll-2 Eltern-Kreuzung (Versuchsergebnisse II) experimentelle Zahlwerte von

$$E_i = 0,896$$

$$E_k = 0,816$$

$$E_j = 0,756$$

entnehmen. (Die Bedeutung der Größen E ist aus dem Anhang dieser Arbeit ersichtlich.) Die vierte Größe (E_0) ist aus symmetrischen 2 Eltern-Kreuzungen prinzipiell nicht zu gewinnen. Sie ließe sich aus den Rekombinantenanteilen der 3 Allel-Kreuzung selbst errechnen. Wegen der Asymmetrie der Hr/Hr^+ -Reifung wäre aber eine solche Berechnung ohne wirklichen Wert. Nehmen wir jedoch paarweise Kooperation ($Q=2$) als a priori Kenntnis an, so läßt sich

$$E_0 = 0,743$$

aus den Werten für E_i , E_k und E_j der Kontroll-2 Eltern-Kreuzung errechnen. Für diese Bestimmung ist nur die experimentell gerechtfertigte Annahme einer konstanten Reifungsrate erforderlich, denn auch verschiedene Werte von α

(vgl. Anhang) führen zum gleichen Wert für E_0 . Sind uns auf diese Weise alle vier Größen E aus der Kontroll-Kreuzung zugänglich, so läßt sich auch das zu erwartende BD/TD-Verhältnis (für symmetrische 3 Eltern-Infektion) berechnen:

$$\frac{b_{111}}{b_{311}} = \frac{1 + 2E_j - E_i - E_k - E_0}{1 - E_j - E_i - E_k + 2E_0} \approx 3.$$

Dieser Erwartungswert basiert also auf der experimentell einwandfreien Kontroll-Kreuzung und der Annahme einer paarweisen Kooperation. Er steht im Gegensatz zu dem BD/TD-Verhältnis von etwa 1,5, das sich unabhängig von der Hr/Hr^+ -Asymmetrie als Mittelwert aus vier äquivalenten 3 Allel-Kreuzungen ergab. Diese offensichtliche Diskrepanz zeigt, daß entweder die benutzte Annahme der paarweisen Kooperation ($Q = 2$) oder eine andere der Annahmen, auf denen die mathematische Analyse der Populationsgenetik beruht, inkorrekt war.

Der berechnete hohe Wert des BD/TD-Verhältnisses erwächst im wesentlichen aus den niedrigen Rekombinantenprozentsätzen der Kreuzungen, die anzeigen, daß effektive Rekombinationen relativ seltene Ereignisse sind. Infolgedessen sind TD, die bei paarweiser Kooperation zwei konsekutive Ereignisse verlangen, wesentlich weniger häufig als BD, die nur eine dieser seltenen Kooperationen benötigen. Spezielle Annahmen über die Art der Interferenz in den einzelnen Kooperationen können uns nicht aus diesem Dilemma befreien, da die Berechnung des BD/TD-Verhältnisses (und auch die der Kreuzungskonstanten) frei von allen speziellen Annahmen über die Interferenz ist. Hingegen könnte der Widerspruch beseitigt werden, wenn die Phagennachkommenschaft aus Teilpopulationen bestünde, die sehr unterschiedliche Wahrscheinlichkeiten für Rekombinationsakte hatten. Nimmt man in grober Verdeutlichung z. B. an, daß ein großer Teil der Nachkommenschaft überhaupt keine Möglichkeit zur Rekombination hatte, dann steigen die relativen Prozentsätze in der Restpopulation, und die Rekombinationsereignisse sind in dieser entsprechend häufiger. Das wiederum machte die Entstehung von TD in zwei konsekutiven Kooperationen wahrscheinlicher.

Für die Existenz derartiger Teilpopulationen kann — wie bereits gezeigt — nicht der unterschiedliche Reifungszeitpunkt der einzelnen Partikel herangezogen werden. Denn solange nur die Reifung in konstanter Rate erfolgt, berechnet sich das gleiche BD/TD-Verhältnis wie ohne Berücksichtigung der Reifung. Als Erklärung scheint dagegen eine Fluktuation unter den Wirtsbakterien oder eine Topographie in der Wirtszelle möglich:

1. *Bakterienfluktuation.* Die Populationstheorie der Phagenkreuzung geht von der Voraussetzung einheitlicher Wirtsbakterien aus, d. h. sie nimmt in allen Wirtszellen eine gleiche a priori-Wahrscheinlichkeit für Phagenrekombination an. Wäre diese Annahme nicht erfüllt, so bestünde die Phagennachkommenschaft aus Teilpopulationen mit unterschiedlichen Mp -Werten. Am Beispiel der Reifung konnte jedoch gezeigt werden, daß für gleich große Teilpopulationen mit linear steigenden Mp -Werten das BD/TD-Verhältnis dem eines mittleren Mp -Wertes entspricht. Demzufolge würde auch für Gauss-artige Verteilungen sich kein Einfluß ergeben, da diese aus mehreren gleichmäßigen Verteilungen mit dem gleichen mittleren Mp -Wert zusammengesetzt gedacht werden können. Das Argument der Bakterienfluktuation scheint daher nur dann von Bedeutung, wenn gezeigt werden könnte, daß in einem beachtlichen Teil der Bakterien

prinzipiell gar keine oder nur sehr wenige Kooperationen ablaufen können. Eine solche Annahme ist jedoch kaum mit den Daten von Einzelwurf-Experimenten in Einklang zu bringen.

2. *Topographie*. Eine andere Voraussetzung der Phagen-Populationsgenetik ist die der völligen Homogenität des Phagenpools innerhalb der Wirtszellen. Das heißt, dieser Pool vegetativer Phagen im Bakterium wird als jederzeit vollkommen durchmischt behandelt. Die Berechtigung dieser Annahme wurde jedoch kürzlich von TRAUTNER (1960) sehr in Frage gestellt. Auf Grund der Abhängigkeit der Rekombinationswahrscheinlichkeit von der Zahl der infizierenden Partikel, wurde statt des homogenen Pools eine Topographie innerhalb der Bakterienzelle angenommen. Hiernach vermehren sich die eingedrungenen Parentalpartikel zunächst in getrennten „Arealen“ innerhalb der Zelle. Diese Areale weiten sich im Laufe der Latenzperiode aus und durchdringen einander. Unter diesen Umständen würden zu Beginn der Latenzperiode die meisten Kooperationen zwischen genetisch identischen Strukturen ablaufen und infolgedessen nicht zu Rekombination führen. Genetische Rekombinanten würden nur in „Durchdringungs-Arealen“ und vorwiegend spät in der Latenzperiode auftreten. Ein großer Teil der Phagennachkommenschaft würde aus genetisch einheitlichen Arealen stammen und als Elterntypen in der Nachkommenschaft erscheinen, wodurch der Eindruck erweckt würde, daß nur wenige Kooperationen im Pool stattgefunden hätten.

Die Vorstellung einer derartigen Topographie würde die Diskrepanz zwischen erwartetem und gefundenem BD/TD-Verhältnis verständlich und die experimentellen Daten mit der Annahme von paarweiser Kooperation vereinbar machen. Eine Schwierigkeit dieser Interpretation ergibt sich jedoch aus folgendem: TD-Partikel können lediglich in triparentalen Arealen gebildet werden, BD dagegen auch in biparentalen Arealen. Bleibt man bei der Annahme, daß große Teile der Phagennachkommenschaft aus uniparentalen Arealen stammen, dann sollten in der Zelle auch beträchtliche biparentale Areale vorliegen, die zwar BD, aber nicht TD produzieren könnten. Weiter sollten ja selbst innerhalb der triparentalen Areale mehr BD als TD entstehen, da diese bei paarweiser Kooperation nach wie vor nur eine, jene aber zwei konsekutive Kooperationen verlangen.

Eine quantitative Abschätzung dieses nur qualitativen Gegenarguments erscheint unmöglich, solange die Frage der Topographie nicht mathematisch behandelt worden ist.

II. *Komplette Kooperation*

Betrachten wir nun die Interpretation der gewonnenen Daten durch die Annahme einer kompletten Kooperation. Nach dieser Vorstellung sollte während der ganzen Latenzperiode ein neu entstehendes Rekombinantenpartikel unter der gleichberechtigten Kontrolle aller Strukturen des Pools gebildet werden. Findet bei der Bildung einer neuen Struktur eine Doppelrekombination statt, so sollten gewöhnlich 3 Elternstrukturen die genetische Information der Rekombinante liefern. Die Doppelbeteiligung einer individuellen Elternstruktur dürfte nur im Rahmen der Zufallserwartung auftreten. Dementsprechend sollten in einer 3 Allel-Kreuzung BD und TD-Rekombinanten in gleicher Zahl produziert werden. Die durchgeführten Kreuzungen zeigen aber übereinstimmend eine

bevorzugte Produktion von BD, besonders zu Beginn der Latenzperiode. Dieser Befund beweist, daß *entweder* eine überstatistisch häufige Doppelbeteiligung einer individuellen Elternstruktur auftritt (inkomplette Kooperation) *oder*, daß in frühen Stadien unter den drei an einer Doppelrekombination beteiligten Elternstrukturen häufiger als Zufallserwartung zwei genetisch identische Strukturen sind. Die erste Alternative kann dabei den experimentellen Befund aus den Eigenschaften des Rekombinationsmechanismus selbst erklären, während im zweiten Fall — wie schon bei der Deutung durch paarweise Kooperation — ein Sekundärphänomen, nämlich die Topographie, als Ursache der Doppelbeteiligung genetisch identischer Eltern angesehen würde. In diesem Bild entstehen zu Beginn der Latenzperiode zunächst biparentale Areale, in denen nur die BD-Rekombinante gebildet werden kann. Erst später entwickeln sich triparentale Areale, in denen BD und TD in gleicher Häufigkeit produziert würden. Ein verbleibender Rest von Topographie würde auch gegen Ende der Latenzperiode insgesamt noch etwas häufiger BD als TD-Rekombinanten entstehen lassen.

III. Schlußbetrachtung

Die vorgelegten Versuchsergebnisse wurden unter verschiedenen Annahmen über den Kooperationsgrad Q mit folgendem Ergebnis diskutiert: das beobachtete BD/TD-Verhältnis von etwa 1,5 ist vereinbar

1. mit der Vorstellung von prinzipiell paarweiser Kooperation ($Q = 2$). Jedoch sind dann mathematisch noch nicht erfaßbare Sekundäreffekte vorhanden, die die Rekombinationswahrscheinlichkeiten kleiner erscheinen lassen, als sie tatsächlich sind. Als plausibelste Erklärung hierfür konnte eine unvollkommene Durchmischung des vegetativen Pools angesehen werden.

2. mit inkompletter Kooperation, ohne daß notwendigerweise Sekundäreffekte wie Topographie herangezogen werden müssen. Ohne Topographie würde ein formaler Wert von etwa $Q = 1,4$ den experimentellen Ergebnissen am besten entsprechen.

3. mit kompletter Kooperation ($Q = 1$). Für die bevorzugte Produktion der BD-Rekombinanten, besonders zu Beginn der Latenzperiode wäre wiederum das Vorhandensein einer Topographie innerhalb der Bakterienzelle verantwortlich.

Zusammenfassend muß also festgestellt werden, daß die gestellte Frage nach der Größe des Kooperationsgrades mit Hilfe der vorgelegten Versuche noch nicht entschieden werden konnte, obwohl insgesamt die prinzipielle Begrenzung auf nur zwei kooperierende Elternstrukturen weniger wahrscheinlich wirkt. Andererseits kann jedoch in den durchgeführten Experimenten ein weiterer Hinweis auf die Existenz einer Topographie gesehen werden.

Anhang

Zur Streuung des Reifungszeitpunktes in der Populationsgenetik von Bakteriophagen

In einer vorangehenden Arbeit (BRESCH und STARLINGER 1958) wurde die verallgemeinerte Differentialgleichung der Populationsgenetik von Phagen aufgestellt und gelöst. In dieser Arbeit wurden speziell die beiden Grenzfälle von paarweiser und kompletter Kooperation behandelt. Für den allgemeinen Fall (inkomplette Kooperation) ergab sich als Lösung folgendes Gleichungssystem:

$$\begin{aligned}
 a_{ijk} = & A + (B - B_j) \cdot e^{-Mp_I - Mp_{II} + Mp_I p_{II} C} \\
 & + B_i \cdot e^{-Mp_{II}} \\
 & + B_k \cdot e^{-Mp_I} \\
 & + B_j \cdot e^{-Mp_I - Mp_{II} + Mp_I p_{II} CQ}
 \end{aligned} \tag{A1}$$

Die Bedeutung der Symbole ist bei BRESCH (1959) ausführlich diskutiert. Die Größe a_{ijk} ist der Anteil des genetischen Typs ijk im Pool der vegetativen Partikel. Der Prozeß der Reifung ist also in Gleichung (A1) noch nicht berücksichtigt.

Die Annahme einer konstanten Reifungsrate und linear im Pool ansteigender Rekombinationswahrscheinlichkeiten¹ (Mp -Werte) wurde bereits von VISCONTI und DELBRÜCK (1953) getroffen und ist durch Versuche von DOERMANN (1953) an T4 und für T1 durch BRESCH und TRAUTNER (1955) gerechtfertigt. Damit berechnen sich die Rekombinantenanteile in der Nachkommenschaft einer Phagenkreuzung zu

$$b_{ijk}(a_{ijk}, \alpha) = \frac{\int_{\alpha t_L}^{t_L} a_{ijk}(t) dt}{\int_{\alpha t_L}^{t_L} dt} \tag{A2}$$

Hierin sind die Integrationsgrenzen t_L : der Zeitpunkt der Lyse und αt_L : der Zeitpunkt des Beginns der Reifung ($0 < \alpha < 1$).

Nach Einsetzen der Funktionen für a_{ijk} und Integration erhält man Ausdrücke des allgemeinen Typs

$$E(v) = \frac{e^{-\alpha v} - e^{-v}}{v(1 - \alpha)}, \tag{A3}$$

die in der Endgleichung für b_{ijk} viermal erscheinen:

$$b_{ijk} = A + (B - B_j) \cdot E_0 + B_i \cdot E_i + B_k \cdot E_k + B_j \cdot E_j \tag{A4}$$

wobei

$$\begin{aligned}
 E_0 &= E(Mp_I + Mp_{II} - Mp_I p_{II} C) \\
 E_i &= E(Mp_{II}) \\
 E_k &= E(Mp_I) \\
 E_j &= E(Mp_I + Mp_{II} - Mp_I p_{II} CQ)
 \end{aligned}$$

Die Funktion $E(v)$ ist für 5 Werte von α graphisch in Abb. 4 wiedergegeben. Sie ermöglicht die Berechnung der 4 Kreuzungskonstanten Mp_I , Mp_{II} , C/M und Q aus den experimentell gewinnbaren Größen E_0 , E_i , E_k und E_j unter Berücksichtigung einer Reifung mit konstanter Rate. Der jeweils passende Wert von α muß aus Versuchen mit vorreifer Lyse unabhängig experimentell ermittelt werden. Er liegt unter normalen Bedingungen für alle bisher genetisch genauer untersuchten Phagen bei etwa $\alpha = 1/3$.

Die Größen E_0 , E_i , E_k und E_j gewinnt man durch geeignete Addition und Mittelwertbildung (das Gleichungssystem ist vielfach überbestimmt) aus den experimentellen Werten der b_{ijk} . Beachtenswert ist, daß die Zahlwerte der 4 Funktionen E daher invariant gegenüber allen Annahmen die Reifung betreffend sind. Derartige Annahmen wirken sich erst bei der Berechnung der eigentlichen 4 Kreuzungskonstanten aus den 4 Werten der $E(v)$ aus.

¹ Genauer die Wahrscheinlichkeit im Stammbaum eines vegetativen Partikels bereits Rekombination zu finden.

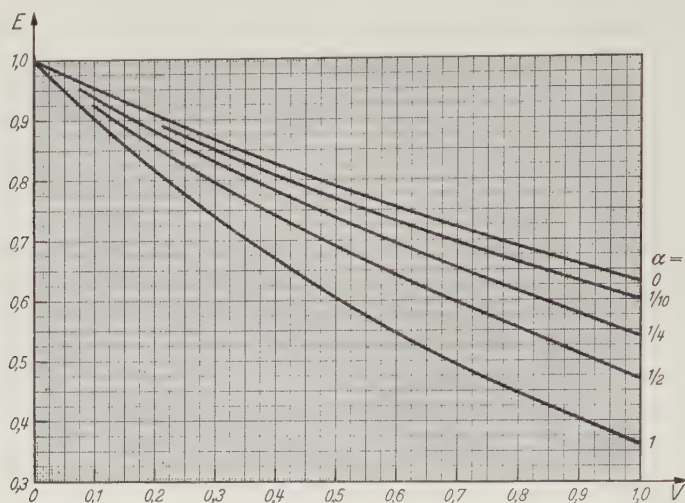


Abb. 4. Die zur Berücksichtigung der Reifung erforderliche Funktion $E(v)$ für 5 Werte des Parameters α

Summary

Four equivalent triparental-3 factor-3 alleles crosses of the type $121 \times 212 \times 322$ are performed with linked markers in bacteriophage T1. Total recombinants and specially the biparental doubles (BD) of the type 111 and the triparental doubles (TD) of the type 311 are scored. The results support the idea of a topography and give therefore no conclusive evidence whether the process of cooperation is restricted to two parental structures or not.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung dieser Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

Literatur

- BRESCH, C.: Recombination in bacteriophage. *Ann. Rev. Microbiol.* **13**, 313 (1959).
 BRESCH, C., u. H. D. MENNIGMANN: Weitere Untersuchungen zur Genetik von T1-Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **9b**, 212 (1954).
 BRESCH, C., u. T. TRAUTNER: Zur Kinetik der Rekombinantenbildung bei T1-Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **10b**, 436 (1955).
 BRESCH, C., u. T. TRAUTNER: Die Bedeutung des Zweifarb-Nährbodens für genetische Untersuchungen am Bakteriophagen T1. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 590 (1956).
 BRESCH, C., u. P. STARLINGER: Zum Problem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 459 (1958).
 DOERMANN, A. H.: The intracellular growth of bacteriophages. *J. gen. Physiol.* **35**, 645 (1952).
 DOERMANN, A. H.: The vegetative state in the life cycle of bacteriophage. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **18**, 3 (1953).
 HERSHEY, A. D.: The production of recombinants in phage crosses. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **23**, 19 (1958).
 LENNOX, E. S., C. LEVINTHAL and F. SMITH: The effect of finite input in reducing recombinant frequency. *Genetics* **38**, 508 (1953).
 TRAUTNER, T.: The influence of the multiplicity of infection on crosses with bacteriophage T1. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 259 (1960).
 VISCONTI, N., and M. DELBRÜCK: The mechanism of genetic recombination in phage. *Genetics* **38**, 5 (1953).

R. HAUSMANN und C. BRESCH,
 Abteilung für Mikrobiologie, Botanisches Institut der Universität Köln,
 Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15

Aus dem Botanischen Institut der Universität Erlangen

KEIMVERSUCHE AUF GENETISCHER GRUNDLAGE

III. DER EINFLUSS DES FAKTORS *ch* AUF DIE KEIMUNG*

Von

J. SCHWEMMLE

Mit 18 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. Juli 1960)

Im Jahre 1940 wurde die *Oenothera Berteriana* (*B·l*) mit den Komplexen *B* und *l* mit einer *l·v* mit *odorata*-Plasma und -Plastiden gekreuzt. Diese war die F_{11} einer *l·v* aus der Kreuzung *Oe. odorata* (*v·l*) \times *Oe. Berteriana* (*B·l*). In der Aufzucht waren es 32 *B·l* und 41 *l·v*, von denen 14 gescheckt waren. Nur diese beiden Formen sind in der Kreuzung *B·l* \times *l·v* zu erwarten, da die wenigen *l·l* als Embryonen absterben und die *B*-Samenanlagen durch die *v*-Schläuche nicht oder nur ganz selten befruchtet werden. Die gescheckten *l·v* zeigen, daß die als ♂ verwendete *l·v* tatsächlich *odorata*-Plastiden besaß, da diese — durch die *v*-Schläuche übertragen — nicht zu ergrünen vermögen. Die *B·l* konnte nicht gescheckt sein, da durch die *l*-Schläuche keine Plastiden übertragen werden. Drei *B·l* wurden geselbstet. In den 3 Aufzuchten des Jahres 1941 waren es, wie zu erwarten, lauter *B·l*. Aus jeder der 3 Aufzuchten wurde eine Pflanze geselbstet und 1942 aus jeder dieser Selbstungen 15 Pflanzen aufgezogen. In einer der drei Aufzuchten fielen neben typischen *B·l* 4 *B·l* mit hellgrünem Laub auf. Warum diese chlorina-Mutanten so gehäuft auftraten, ist unbekannt. Von ihnen wurde weitergezüchtet. PIRSON untersuchte die Mutanten. Er konnte zeigen, daß die hellgrüne Färbung durch einen rezessiven Faktor bedingt ist. Bemerkenswert ist dessen pleiotrope Wirkung. Dies ist aus der Mitteilung HAUSTEINS zu entnehmen, der die weitere vielversprechende Untersuchung übernommen hat. Besonders auffallend ist, daß bei einer \bar{ch} -Komplexheterozygote der die chlorina-Färbung bedingende Faktor *ch* besonders leicht von einem Komplex auf den anderen übergeht. Selbst wenn diese in der Meiosis einen Vierzehnerring besitzt, haben wir praktisch eine freie Spaltung.

Nun hatten Keimversuche, über die an anderer Stelle berichtet wurde, ergeben, daß die verschiedenen Komplexe einen charakteristischen Einfluß auf die Lichtbedürftigkeit der Samen bei der Keimung und den Keimverlauf haben. So bedingt der *l*-Komplex der *Oe. Berteriana* (*B·l*) besonders starke Lichtabhängigkeit und einen langsamen Keimverlauf. Die Gunst des Materials ermöglichte es, den Einfluß von 3, 2, ja sogar einem *l*-Chromosom zu erfassen.

Es war nun die Frage, ob nicht am Ende ein einziger Faktor sich bei der Keimung auswirkt. Es lag nahe, daraufhin den Faktor *ch* zu prüfen, eben wegen seiner ausgesprochenen pleiotropen Wirkung.

* Herrn Prof. Dr. F. OEHLKERS zum 70. Geburtstag gewidmet.

SCHNEIDER hat 1956 eine Anzahl von Versuchen mit Samen der ursprünglichen *Oe. Berteriana* ($B \cdot l_T$) und der $B_{ch} \cdot l_{ch}$, die auch den sich allerdings nicht manifestierenden Tupfungsfaktor T besitzt, gemacht. Die $B \cdot l_T$ wurde mit einbezogen. Bei ihr ist das l_2 -Chromosom mit dem Tupfungsfaktor T gegen das I_2 -Chromosom ausgetauscht; deshalb haben die $B \cdot l_T$ ungetupfte Petalen. Über diese Untersuchungen wird zuerst berichtet. Die Versuche wurden dann 1958 und 1959 wiederholt und auf andere Formen ausgedehnt. Über deren Herkunft wird dann jeweils bei der Besprechung der Versuche einzugehen sein.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich an dieser Stelle für die Unterstützung auch dieser Versuche, ebenso Fr. Dr. RICHTER für ihre Hilfe.

1. Versuche mit Samen der $B \cdot l_T$, $B \cdot l_t$ und $B_{ch} \cdot l_{ch}$

a) Vom 16. 4. bis 15. 7. 56 wurden 11 Versuche mit Samen der $B \cdot l_T$ und $B \cdot l_t$ gemacht, dazu noch 6 Versuche mit Samen der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ in der Zeit vom

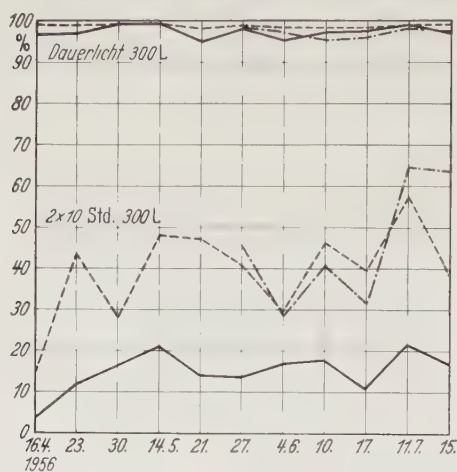


Abb. 1. Prozent Keimung.

— $B \cdot l_T$
 - - - $B \cdot l_t$
 - · - $B_{ch} \cdot l_{ch}$

27. 5. bis 15. 7. 56. Die Samen waren 1955 geerntet worden. Die Daten in den Abbildungen geben an, an welchem Tag der Versuch jeweils angesetzt wurde. Wegen der Versuchsanordnung sei auf die erste Mitteilung (SCHWEMMLE 1959) verwiesen. Belichtet wurde eine Versuchsreihe je 10 Std am 1. und 2. Tag (300 Lux), eine zweite am 1. Tag 10 Std und vom 2. Tag an kontinuierlich (Dauerlichtversuche). Am 10. Tag war die Keimung abgeschlossen. Die Ergebnisse können an Hand der Abb. 1 besprochen werden.

Die $B \cdot l_T$ -Samen keimten im Dauerlicht zu 95,3—99,4%, also sehr gut. Die Schwankungen sind diesmal auffallend gering. Noch besser keimten

die Samen der $B \cdot l_t$ (98,3—99,7%), nicht viel anders diejenigen der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ (95,8—98,8%).

In den 2×10 Std-Versuchen keimten die Samen der $B \cdot l_T$ am schlechtesten. Besonders gering ist die Keimung bei dem Versuch vom 16. 4., nimmt dann aber — wohl als Folge der Nachreife — ständig zu bis zu einem 1. Maximum am 14. 5. Ein 2. Maximum ist bei dem Versuch vom 11. 7. vorhanden. Die Samen der $B \cdot l_t$ keimten bei den gleichen Versuchsbedingungen durchwegs wesentlich besser. Sie sind also weniger lichtbedürftig als die Samen der $B \cdot l_T$, weil das l_2 -Chromosom gegen das I_2 -Chromosom ausgewechselt wurde. Das gleiche wurde auch sonst gefunden. Die beiden bei der $B \cdot l_T$ nur angedeuteten Maxima sind bei der $B \cdot l_t$ ebenfalls vorhanden und wesentlich ausgeprägter. Auch die Schwankungen in der Keimung sind sehr viel größer. Es ist aber wenig wahrscheinlich, daß sie durch Schwankungen der Temperatur und des Lichtes bedingt waren, da auf möglichst große Konstanz der Versuchsbedingungen geachtet wurde. Eine Erklärung kann wie in anderen Fällen nicht gegeben werden.

Besonders auffallend ist, daß etwa zur selben Zeit durchgeführte Parallelversuche mit Samen der gleichen $B \cdot l_T$ und $B \cdot l_t$ aus dem Jahre 1955 viel geringere Unterschiede in der Keimung zeigten (SCHWEMMLE 1960, Abb. 15). Vielleicht waren die Samen von SCHNEIDER für ihre in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche viel früher geerntet worden. Denn spätere Untersuchungen haben gezeigt, daß sich das Erntedatum bei der Keimung auswirkt. Möglicherweise war auch der Umstand von Bedeutung, daß SCHNEIDER ihre Schalen in einem mit schwarzem Papier ausgeschlagenen Thermostaten stehen hatte; der

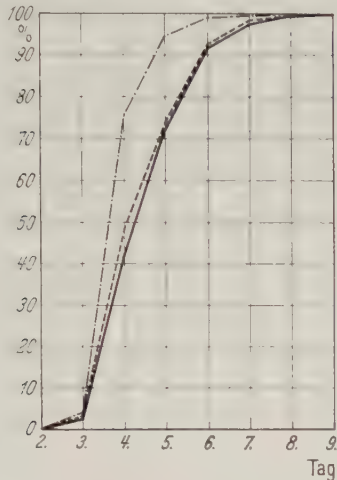


Abb. 2. Keimverlauf bei den 2×10 Std 300 Lux-Versuchen.

— $B \cdot l_T$
 - - - $B \cdot l_t$
 - · - · $B_{ch} \cdot l_{ch}$

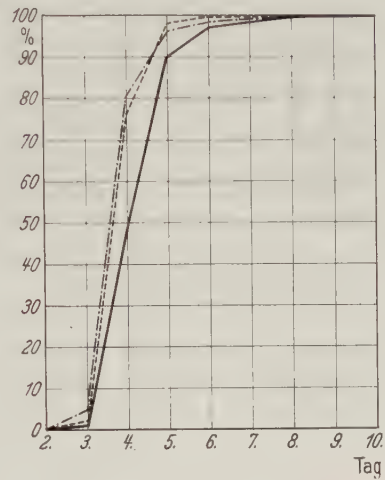


Abb. 3. Keimverlauf bei den Dauerlichtversuchen.

— $B \cdot l_T$
 - - - $B \cdot l_t$
 - · - · $B_{ch} \cdot l_{ch}$

Thermostat für die anderen Versuche war mit weißem Papier ausgeschlagen gewesen (s. dazu auch BORRISS 1941). Wie dem auch sei, jedenfalls haben die hier besprochenen Versuche eindeutig gezeigt, daß die $B \cdot l_t$ -Samen weniger lichtbedürftig sind als die $B \cdot l_T$ -Samen.

Die Keimung der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen ist fast genauso wie die der $B \cdot l_t$ -Samen, also wesentlich besser als die der $B \cdot l_T$ -Samen. Nur in den letzten beiden Versuchen liegt die Keimkurve für die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ deutlich über der der $B \cdot l_t$ -Samen. Es sieht also so aus, als ob vom 11. 7. an die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen weniger lichtbedürftig seien. Leider war es nicht möglich, die Versuche fortzuführen, da die Samen ausgegangen waren. Auf jeden Fall erniedrigt aber der Faktor ch die Lichtbedürftigkeit der Samen. Er hebt gewissermaßen die Wirkung des bei der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ vorhandenen l_{2T} -Chromosoms auf, weswegen die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen etwa so keimen wie die $B \cdot l_t$ -Samen. Würden sie später besser gekeimt haben, was wahrscheinlich ist, so würde auch die Einwirkung der anderen l -Chromosomen teilweise zurückgedrängt worden sein.

Da jeden Tag zur gleichen Zeit die gekeimten Samen ausgezählt wurden, läßt sich auch der Einfluß der genetischen Konstitution auf den Keimverlauf erfassen. Die Werte der jeweils 6 Versuche vom 27. 5. bis 15. 7. 56 wurden zusammengekommen, da diese Mittelwertskurven das gleiche zeigen wie diejenigen für die

einzelnen Versuche. In der Abb. 2 ist der Keimverlauf für die 2×10 Std.-Versuche gezeichnet. Am langsamsten keimten die $B \cdot l_T$ -Samen, nur geringfügig schneller die $B \cdot l$ -Samen. Das ist auch sonst der Fall. Auffallend viel schneller keimten die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen, auch in den Versuchen, in denen ihre Gesamtkeimung schlechter war als die der $B \cdot l$ -Samen. Die vielfach festgestellte Beziehung zwischen Lichtbedürftigkeit und Keimgeschwindigkeit, nämlich daß die weniger lichtbedürftigen Samen auch schneller keimen, ist im vorliegenden Fall nicht immer vorhanden.

Den Keimverlauf für die Dauerlichtversuche zeigt Abb. 3. Wieder keimen die $B \cdot l_T$ -Samen am langsamsten. Aber der zuvor vorhandene große Unterschied zwischen den $B \cdot l$ - und $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen ist verschwunden. Vergleicht man die Abb. 2 und 3, so stellt man fest, daß die $B \cdot l_T$ -Samen im Dauerlicht schneller keimen; noch mehr ist das bei den $B \cdot l$ -Samen der Fall. Dagegen keimen die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen beidemal gleich schnell, was immerhin bemerkenswert ist.

b) Wenn in den vorbesprochenen Versuchen die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen weniger lichtbedürftig waren und schneller keimten als die $B \cdot l_T$ -Samen, so war das möglicherweise gar nicht eine Wirkung der Faktors *ch*, sondern des bei der *l*·v F_{11} *od. Pl.* (— *odorata*-Plasma) nachgewiesenermaßen veränderten *l*-Komplexes. Diese Veränderung hat ja auch z. B. das Verschwinden der Tupfung zur Folge. Die $B \cdot l_T$, aus der die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ entstand, enthielt ja, wie eingangs ausgeführt, diesen veränderten *l*-Komplex. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit Samen einer $B_{ch} \cdot l_{ch}$ wiederholt, die sicher den unveränderten *l*-Komplex der *Oe. Berteriana* ($B \cdot l$) besitzt. Sie wurde folgendermaßen erhalten:

1955:	$B \cdot l_T \times v \cdot I$ (ursprünglich)
	↓
1956:	$B_{ch} \cdot l_{ch} \times l_T \cdot v F_1$ <i>Bert. Pl.</i>
	↓
1957:	$B_{ch} \cdot l_T$ (normal grün)
	↓ Selbstung
1958:	$B_{ch} \cdot l_{chT}$ (hellgrün).

Bei der 1957 aufgezogenen normal grünen $B_{ch} \cdot l_T$ war also der l_{ch} -Komplex, auf die *l*·v F_{11} *od. Pl.* zurückgehend, gegen den ursprünglichen l_T -Komplex der *Oe. Berteriana* ausgewechselt worden. Aus der Selbstung dieser $B_{ch} \cdot l_T$ wurde dann 1958 eine hellgrüne $B_{ch} \cdot l_{chT}$ erhalten, weil der Faktor *ch* leicht vom B_{ch} -Komplex auf den l_T -Komplex übergeht. Diese hat noch das *l2*-Chromosom mit dem Tupfungsfaktor, obwohl er sich unter dem Einfluß des Faktors *ch* nicht zu manifestieren vermag. Wenn die Samen der so erhaltenen $B_{ch} \cdot l_{chT}$ anders keimen als diejenigen der ursprünglichen $B \cdot l_T$, so kann das nur durch den Faktor *ch* bedingt sein.

1958 wurden von diesen beiden Formen aus den Aufzuchten HAUSTEINS jeweils gleichzeitig (vom 31. 8. bis 8. 9. 58) Samen geerntet¹. Für die vom 20. 11. 58 bis 4. 3. 59 angesetzten 13 Parallelversuche mit je etwa 400 Samen wurden jeweils nur Samen vom gleichen Erntedatum verwendet, um Unterschiede in der Nachreife auszuschließen. Alle Versuche wurden je 10 Std an den ersten 3 Tagen mit 300 Lux belichtet.

¹ An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. HAUSTEIN für die Überlassung des Samenmaterials danken.

Die Abb. 4 zeigt, wie die Samen gekeimt haben. Bei der $B \cdot l_T$ war die Keimung anfänglich schlecht; die Samen waren noch nicht nachgereift. Hernach wurde sie besser und erreichte am 29. 1. 59 ein erstes Maximum mit 24,4%, ein zweites am 18. 2. mit 25%.

Auffallenderweise keimten die Samen der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ von Anfang an sehr viel besser als diejenigen der $B \cdot l_T$; auch ist die Erhöhung der Keimung in den späteren Versuchen nicht so stark wie bei den $B \cdot l_T$ -Samen. Es reifen also die Samen der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ anders nach als diejenigen der $B \cdot l_T$. Dies genauer zu untersuchen würde sich wohl lohnen. Die Schwankungen in der Keimung der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen sind vom 22. 1. an genau die gleichen wie die der $B \cdot l_T$ -Samen. Auch zuvor schon ist bis auf den am 15. 1. 59 angesetzten Versuch eine Übereinstimmung unverkennbar.

Um die Lichtbedürftigkeit der Samen zu erfassen, müssen wir aber noch wissen, wie die Samen maximal keimen konnten. So wurden die Schalen nach 10 Tagen — die Keimung war dann praktisch abgeschlossen — aus dem Thermostaten genommen und auf einen Tisch des Laboratoriums am Fenster gestellt. Erfahrungsgemäß erhalten wir unter diesen Umständen die höchstmögliche Keimung. Diese war nach weiteren 10 Tagen zu Ende. Es wurde dann ermittelt, wie viele

Samen insgesamt vom 1.—20. Tag gekeimt hatten und das Keimprozent errechnet. Die Abb. 5 zeigt die Kurven dieser „Nachkeimung“.

Die $B \cdot l$ -Samen keimten, weil noch nicht nachgereift, anfangs sehr schlecht. Mit zunehmendem Alter wurde die Keimung immer besser. Schon in dem am 18. 2. 59 begonnenen Versuch hatten nach 20 Tagen 88,7% der Samen gekeimt. Da die Samen der $B \cdot l$ zu etwa 96% zu keimen vermögen, ist also zu diesem Zeitpunkt die Nachreife fast, aber noch nicht völlig abgeschlossen. Auch hier haben wir große Schwankungen, die ähnlich denen bei den 3×10 Std-Versuchen sind, trotz der vollkommen andersartigen Bedingungen. So ist z.B. bei dem Versuch vom 18. 2. 59 beidemale ein deutliches Maximum vorhanden.

Die Samen der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ keimten am Fenster zunächst nicht viel besser als zuvor im Thermostaten. In den letzten Versuchen ist die Differenz etwas größer, da

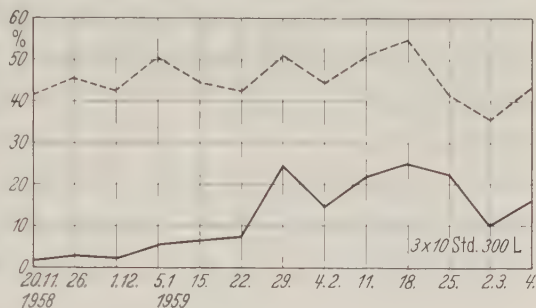


Abb. 4. Prozent Keimung. — $B \cdot l_T$
- - - $B_{ch} \cdot l_{ch}$

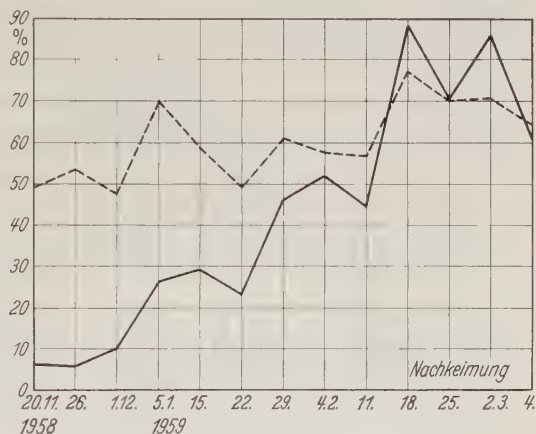


Abb. 5. Nachkeimung. — $B \cdot l_T$
- - - $B_{ch} \cdot l_{ch}$

hier im 3×10 Std-Versuch ein Minimum und bei der Nachkeimung ein Maximum vorhanden ist. Im ganzen gesehen ist aber bei der Nachkeimung der Samen der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ — abgesehen von den kleinen Schwankungen — ein stetiger langsamer Anstieg in der Keimung zu erkennen, in den 3×10 Std-Versuchen aber nicht. Daraus läßt sich schließen, daß in den ersten Versuchen die Samen noch nicht ihr volles Keimvermögen erreicht haben, da auch die optimale Belichtung am Fenster die Keimung nicht nennenswert erhöhen konnte. Vergleichen wir nun noch die beiden Kurven der Abb. 5, so sehen wir, daß sie noch deutlicher als die Kurven der Abb. 4 die Unterschiede in der Nachreife der $B \cdot l$ und $B_{ch} \cdot l_{ch}$ zeigen.

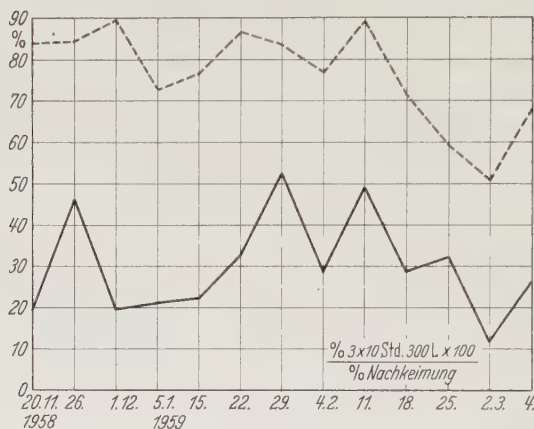


Abb. 6

Abb. 6. Die Lichtabhängigkeit der Keimung. — $B \cdot l_T$; - - - $B_{ch} \cdot l_{ch}$

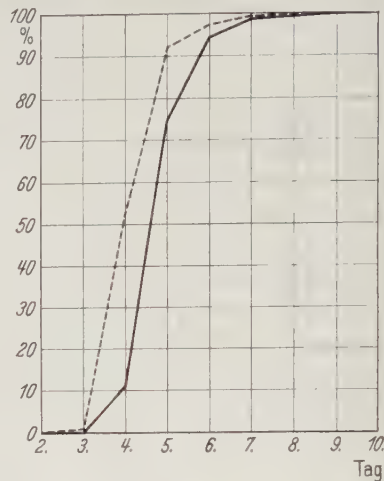


Abb. 7

Abb. 7. Keimverlauf bei den 3×10 Std-Versuchen. — $B \cdot l_T$, 603 gek. Sa. = 18,3 %

- - - $B_{ch} \cdot l_{ch}$ 1695 gek. Sa. = 46,0 %. Die 7 Versuche vom 29. 1. bis 4. 3. 59 zusammengefasst

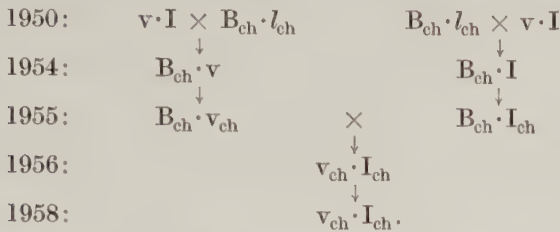
Bei den Versuchen des Jahres 1956 konnten wir ohne weiteres ablesen, welche Samen lichtbedürftiger sind, weil im Dauerlichtversuch die Samen zu fast 100% keimten. Jetzt müssen wir die Werte für die Lichtbedürftigkeit errechnen, indem wir die in den 3×10 Std-Versuchen erhaltenen Werte in Beziehung zu denjenigen der Nachkeimung setzen: $\frac{\% 3 \times 10 \text{ Std } 300 \text{ L} \times 100}{\% \text{ Nachkeimung}}$. Wenn ein Wert

hoch ist, so bedeutet das, daß von den keimfähigen Samen schon im 3×10 Std-Versuch ein großer Teil gekeimt hat. Demzufolge sind die Samen weniger lichtbedürftig als in den Fällen, da die errechneten Prozentsätze gering sind. Für die Kurven der Abb. 6 wurden diese Werte verwendet. Man sieht sofort, daß die $B \cdot l$ -Samen viel lichtbedürftiger sind als die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen. Auf die eigenartigen Schwankungen wird, weil nicht erklärbar, nicht weiter eingegangen. Damit wurden die Ergebnisse der Untersuchungen des Jahres 1956 bestätigt und eindeutig bewiesen, daß der Faktor ch bei der *Oe. Berteriana* die Lichtbedürftigkeit der Samen erniedrigt.

Vergleicht man nun noch den Keimverlauf der $B \cdot l_T$ - und $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen im 3×10 Std-Versuch (Abb. 7), so sieht man deutlich, daß der Faktor ch die Keimung beschleunigt. Damit sind also auch beim Keimverlauf die Versuchsergebnisse von 1956 bestätigt worden (vgl. Abb. 2 und 3).

2. Versuche mit Samen der $v \cdot I$ und $v_{ch} \cdot I_{ch}$

HAUSTEIN hatte 1958 neben der ursprünglichen *Oe. odorata* ($v \cdot I$) auch die hellgrüne $v_{ch} \cdot I_{ch}$ aufgezogen. Ihre Herkunft ist am besten aus dem Stammbaum zu entnehmen.



Die $v_{ch} \cdot I_{ch}$ ist also aus der Kreuzung $B_{ch} \cdot v_{ch} \times B_{ch} \cdot I_{ch}$ erhalten worden. Die Eltern sind von heterozygoten $\frac{1}{2}$ -Vorfahren gleicher komplexheterozygotischer Struktur durch Selbstung abgeleitet. Wie bei der $B_{ch} \cdot l$, so geht auch bei der

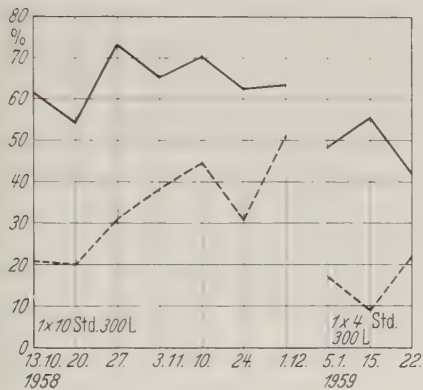


Abb. 8. Prozent Keimung. — $v \cdot I$
 - - - $v_{ch} \cdot I_{ch}$

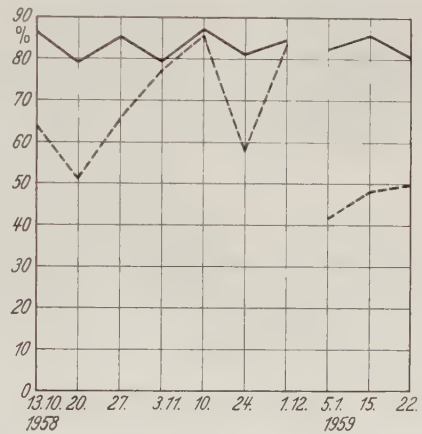


Abb. 9. Nachkeimung. — $v \cdot I$
 - - - $v_{ch} \cdot I_{ch}$

$B_{ch} \cdot v$ bzw. $B_{ch} \cdot I$ der Faktor leicht auf den antagonistischen Komplex über. Die $v_{ch} \cdot I_{ch}$ hat wie die ursprüngliche $v \cdot I$ *odorata*-Plasma und unterscheidet sich von ihr nur durch den Faktor ch .

Die Kapseln der $v \cdot I$ und $v_{ch} \cdot I_{ch}$ wurden vom 31. 8. bis 18. 9. 58 geerntet. Bei den 10 Versuchen (in der Zeit vom 13. 10. 58 bis 22. 1. 59 angesetzt) wurden immer nur Samen vom gleichen Erntedatum ausgelegt. Da die Samen der $v \cdot I$ weniger lichtbedürftig sind als die der $B \cdot l$, wurden sie am 2. Tag 10 Std, bei den letzten 3 Versuchen nur 4 Std, mit 300 Lux belichtet.

Wie Abb. 8 zeigt, keimten die $v \cdot I$ -Samen bereits im 1. Versuch zu 61,7%. Da auch in den folgenden Versuchen die Keimung nicht höher ist — abgesehen von den geringen Schwankungen — ist also am 13. 10. 58 die Nachreife der $v \cdot I$ -Samen schon abgeschlossen.

Auffallenderweise keimten die Samen der $v_{ch} \cdot I_{ch}$, ganz im Gegensatz zu den Befunden der Versuche mit $B \cdot l$ - bzw. $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen, viel schlechter, bei den ersten beiden Versuchen nur zu 21,0 bzw. 19,9%. Dann wird die Keimung laufend

besser, so daß die Unterschiede gegenüber der $v \cdot I$ kleiner werden. Mit Ausnahme des Versuches vom 24. 11. ist der Anstieg sehr stetig ohne die bei der $v \cdot I$ vorhandenen Schwankungen.

Wegen der nur noch geringen Unterschiede zwischen $v_{ch} \cdot I_{ch}$ und $v \cdot I$ in den letzten Versuchen wurde die Belichtung auf 1×4 Std 300 Lux herabgesetzt. Die

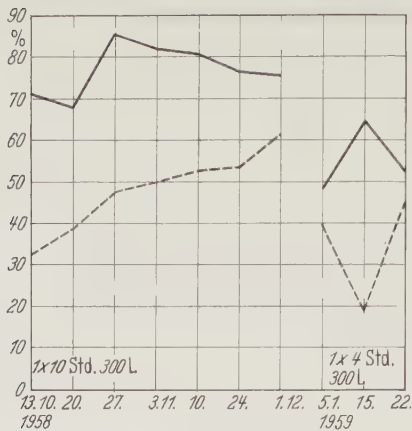


Abb. 10. Die Lichtabhängigkeit der Keimung.

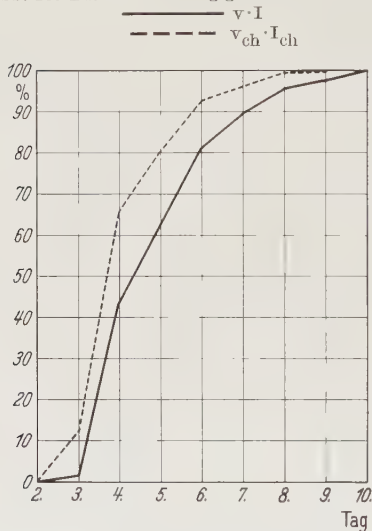


Abb. 11. Keimverlauf bei den 1×10 Std.-Versuchen.
 $v \cdot I$, 476 gek. Sa. = 63,1 %
 $v_{ch} \cdot I_{ch}$ 326 gek. Sa. = 40,6 %.
 Die 2 Versuche vom 24. 11. und 1. 12. 58
 zusammengekommen

$v_{ch} \cdot I_{ch}$ -Samen reagieren darauf stärker als die der $v \cdot I$ und keimen nun wieder wesentlich schlechter als letztere. Der Verlauf der beiden Kurven ist jetzt gerade entgegengesetzt, was dafür spricht, daß nicht etwa ungenügende Konstanz der Versuchsbedingungen (sie werden ja laufend überprüft) für die Schwankungen verantwortlich zu machen ist.

Auch hier wurden, wie bei den Versuchen mit der $B \cdot l$ und der $B_{ch} \cdot l_{ch}$, die Schalen nach 10 Tagen zum Nachkeimen ans Fenster gestellt und nach weiteren 10 Tagen die Versuche abgebrochen. Abgesehen von den geringen Schwankungen ist die Keimung der $v \cdot I$ -Samen bei allen Versuchen etwa gleich. Sie liegt zwischen 79,6 und 87,3 % (Abb. 9). Demgegenüber ist die Gesamtkeimung bei den $v_{ch} \cdot I_{ch}$ -Samen anfänglich mit 64,0 % nicht zu hoch. Sie steigt dann laufend an, um bei dem Versuch vom 3. 11. fast die Werte der $v \cdot I$ -Samen zu erreichen. Nur der Versuch vom 20. 10. fällt heraus. Jetzt erst ist die Nachreife abgeschlossen. Eigenartig ist, daß wir bei der Nachkeimung die gleichen Schwankungen haben wie bei den Keimversuchen im Thermostaten. So ist beim 1×10 Std.-Versuch vom 20. 10. 58 ein leichtes Absinken der Keimung der $v_{ch} \cdot I_{ch}$ -Samen zu erkennen (von 21,0 auf 19,9 %); in der Nachkeimung ist dieses Absinken viel deutlicher (von 64,0 auf 51,6 %). In dem 1×10 Std.-Versuch vom 24. 11. hatten nur 30,7 % der Samen gekeimt gegenüber 45,0 % im Versuch zuvor. Bei der Nachkeimung

sank die Keimung von 85,7 % auf 57,3 % ab. Da Entsprechendes bei einem Teil der Versuche mit $B \cdot l$ -Samen gefunden wurde, ist das wohl kein Zufall. Eine Erklärung kann allerdings nicht gegeben werden.

In den letzten 3 Versuchen, die nur 1×4 Std am 2. Tag belichtet wurden, hatten die $v_{ch} \cdot I_{ch}$ -Samen viel schlechter gekeimt als die $v \cdot I$ -Samen, ebenso bei der Nachkeimung.

In der Abb. 10 sind die Kurven für die Lichtbedürftigkeit der Samen gezeichnet. Die Werte dafür wurden in der üblichen Weise berechnet. Bei den $v_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen nimmt die Lichtbedürftigkeit im 1×10 Std-Versuch laufend ab — offensichtlich eine Folge des Älterwerdens der Samen. Die Kurve für die $v \cdot l$ steigt erst an — abgesehen von dem Versuch vom 20. 10. —, um dann gleichmäßig abzufallen, was auf eine Zunahme der Lichtbedürftigkeit hinweist. Sicher ist, daß die $v_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen zum Keimen mehr Licht benötigen als die $v \cdot l$ -Samen. Auch bei den drei 1×4 Std-Versuchen ist das so.

Ein Vergleich der Versuche mit den $B \cdot l$ - und $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen einerseits und derjenigen der $v \cdot l$ und $v_{ch} \cdot l_{ch}$ andererseits ergibt, daß sich der Faktor ch bei den $v_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen gerade umgekehrt auswirkt als bei den $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen. Letztere sind durchweg weniger lichtabhängig als die $B \cdot l$ -Samen (Abb. 4 und 6) und reifen auch schneller nach (Abb. 5). Demgegenüber sind die $v_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen lichtbedürftiger als die $v \cdot l$ -Samen (Abb. 10) und bleiben in der Nachreife hinter den $v \cdot l$ -Samen zurück. Für die Wirkung des Faktors ch ist es also nicht gleichgültig, in welchem genotypischen Milieu er sich befindet.

Auffallenderweise keimten die $v_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen schneller als die $v \cdot l$ -Samen (Abb. 11), gleich wie die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen schneller gekeimt hatten als die $B \cdot l$ -Samen (Abb. 7). Der Faktor ch beschleunigt also in jedem Fall den Keimverlauf. Bei $v \cdot l$ und $v_{ch} \cdot l_{ch}$ ist die oft festgestellte Beziehung größere Lichtbedürftigkeit — langsamere Keimung jedenfalls nicht vorhanden.

3. Versuche mit Samen der $l \cdot v$ und $l_{ch} \cdot v_{ch}$

Da die Versuche gezeigt hatten, daß sich im Vergleich zu den dunkelgrünen Formen der Faktor ch bei der $B_{ch} \cdot l_{ch}$ gerade umgekehrt auswirkt als bei der $v_{ch} \cdot l_{ch}$, war es von Interesse, zu erfahren, wie es bei einer Form ist, die den einen Komplex von der $B \cdot l$, den anderen von der $v \cdot l$ hat. Das ist bei der $l \cdot v$ bzw. $l_{ch} \cdot v_{ch}$ der Fall. Ihre Herkunft sei kurz beschrieben: aus der Kreuzung $B_{ch} \cdot l_{ch} \times v \cdot l$ erhält man eine $l_{ch} \cdot v$. Sie hat den auf die $l \cdot v$ F_{11} od. Pl. zurückgehenden Komplex l . Aber die oben besprochenen Versuche mit $B \cdot l$ und $B_{ch} \cdot l_{ch}$ haben ja gezeigt, daß das wohl ohne Bedeutung ist. Wird diese $l_{ch} \cdot v$ geselbstet, so treten in der Folgegeneration auf: $l_{ch} \cdot v_{ch}$, die nicht unterscheidbaren $l_{ch} \cdot v$ und $l \cdot v_{ch}$ und dann noch $l \cdot v$, weil der Faktor ch leicht vom l -Komplex auf den v -Komplex übergeht. Die so erhaltenen $l \cdot v$ und $l_{ch} \cdot v_{ch}$ sind also Geschwisterpflanzen, die sich nur im Faktor ch unterscheiden. 1955 wurden sie geselbstet. Auf sie gehen die im Jahr 1956 aufgezogenen $l \cdot v$ und $l_{ch} \cdot v_{ch}$ zurück, ebenso nach erneuter Selbstung die im Jahre 1957 aufgezogenen. In beiden Jahren wurden reichlich Samen geerntet. Vom 24. 11. 58 bis 4. 3. 59 wurden mit ihnen Keimversuche angestellt. Die Samen waren dabei verschieden alt. Diejenigen des Jahres 1956 waren etwa $2\frac{1}{4}$ — $2\frac{1}{2}$ Jahre, die des Jahres 1957 etwa $1\frac{1}{4}$ bis $1\frac{1}{2}$ Jahre gelagert gewesen. Da sich aber die Samen der beiden Ernten verschieden verhalten, müssen die Versuche mit den Samen aus den Jahren 1956 und 1957 zunächst getrennt besprochen werden.

a) *Versuche mit Samen der Ernte 1956.* Bei den beiden ersten Versuchen waren die Samen am 1.—3. Tag je 10 Std mit 300 Lux belichtet worden. Da bereits bei dem 2. Versuch kein Unterschied mehr zwischen $l \cdot v$ - und $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen zu erkennen war, wurde die Belichtung auf 2mal je 10 Std herabgesetzt.

Wie Abb. 12 zeigt, keimten in den folgenden 8 Versuchen die Samen der $l_{ch} \cdot v_{ch}$ deutlich schlechter als die der $l \cdot v$. In den beiden letzten Versuchen dieser Serie ist es aber gerade umgekehrt, ebenfalls bei den sogenannten Nachkeimungen (Abb. 12).

Es ist also nun so, daß die Ergebnisse der 8 ersten 2×10 Std-Versuche mit denjenigen bei der $v \cdot I$, die der beiden letzten und die der Nachkeimung mit denjenigen der $B \cdot l$ übereinstimmen. Daraus läßt sich folgender Schluß ziehen: der Komplex v_{ch} bzw. der in den Komplex v eingelagerte Faktor ch erhöht die Lichtbedürftigkeit, während der l_{ch} -Komplex sie vermindert. Danach würde die

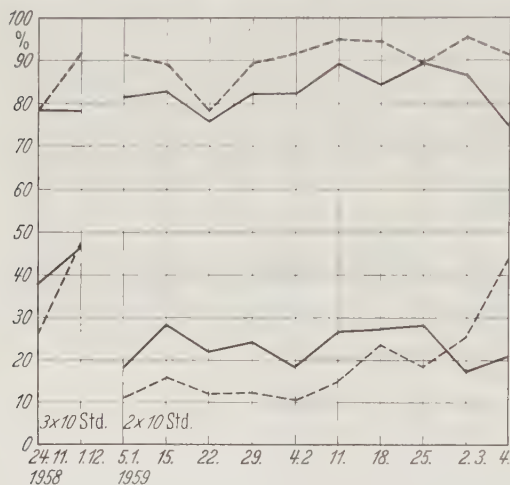


Abb. 12

Abb. 12. Untere Kurven: Keimung bei den 3×10 Std und 2×10 Std-Versuchen. Ernte 1956. Obere Kurven: Keimung bei der Nachkeimung. Ernte 1956.

— $l \cdot v$; --- $l_{ch} \cdot v_{ch}$

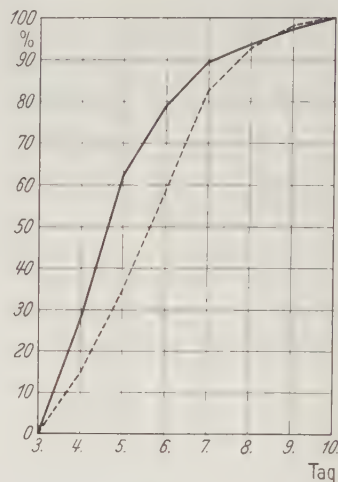


Abb. 13

Abb. 13. Der Keimverlauf bei den Samen der Ernte 1956. — $l \cdot v$, 393 gek. Sa. = 43,0%; --- $l_{ch} \cdot v_{ch}$, 341 gek. Sa. = 35,9%. Die 2 Versuche vom 24. 11. und 1. 12. 58 zusammengefaßt

anfänglich stärkere Lichtbedürftigkeit der $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen durch den v_{ch} -Komplex bestimmt. Dann setzt sich allmählich die Wirkung des l_{ch} -Komplexes durch, was sich in einer Erniedrigung der Lichtbedürftigkeit, also einem Anstieg der Keimprozente ausdrückt. Diese allmähliche Änderung in der Lichtabhängigkeit der Keimung der $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen dürfte also eine Folge des Alterns sein.

Eigenartig ist auch der Keimverlauf. Hier mußten die Versuche gruppenweise zusammengefaßt werden, weil in den Einzelversuchen die Zahl der gekeimten Samen zu gering war. Die Kurven für den Keimverlauf in den 3×10 Std-Versuchen zeigen eine schnellere Keimung der $l \cdot v$ -Samen (Abb. 13), die in diesen Versuchen auch die höheren Keimprozente hatten. Bei den Keimverlaufskurven für die ersten 5 der 2×10 Std-Versuche ist kaum mehr ein Unterschied in der Keimgeschwindigkeit der beiden Formen zu sehen, da hier die $l \cdot v$ -Samen langsamer keimen als vorher, jedoch immer noch etwas schneller als die $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen. In der letzten Versuchsgruppe war dann die Keimung der $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen schneller, entsprechend der höheren Gesamtkeimung. Wir haben hier also einen Fall, wo bei einer besseren Keimung auch der Keimverlauf beschleunigt ist.

Wenn wir uns daran erinnern, daß sowohl die $B_{ch} \cdot l_{ch}$ - wie die $v_{ch} \cdot l_{ch}$ -Samen schneller gekeimt hatten als diejenigen der dunkelgrünen Vergleichsformen, so sind die hier erhaltenen Befunde überraschend.

b) *Versuche mit Samen der Ernte 1957.* Im Gegensatz zu den parallel laufenden Versuchen mit Samen der Ernte 1956 keimten in allen Versuchen die $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen der Ernte 1957 besser als die $l \cdot v$ -Samen aus dem gleichen Jahr (Abb. 14). Auffallend ist das ausgeprägte Maximum bei dem Versuch vom 15. 1. 59, das bei den gleichzeitig angesetzten Versuchen mit Samen des Jahres 1956 ebenfalls angedeutet ist (Abb. 12). Auch bei der Nachkeimung erreichten die $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen — diesmal in Übereinstimmung mit den Samen

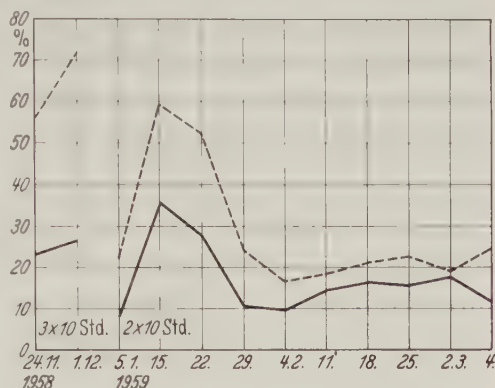


Abb. 14. Prozent Keimung bei den 3×10 Std- und 2×10 Std-Versuchen, Ernte 1957.

— $l \cdot v$; — — — $l_{ch} \cdot v_{ch}$

von 1956 — immer höhere Keimprozent als die $l \cdot v$ -Samen (Abb. 15). Eigenartig ist das Minimum bei dem am 29. 1. angesetzten Versuch, zuvor die gleichmäßige

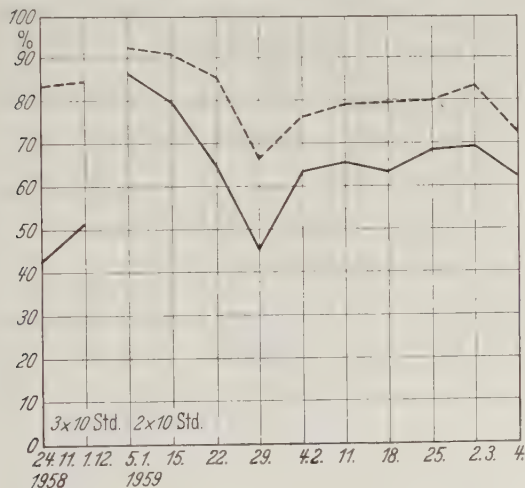


Abb. 15

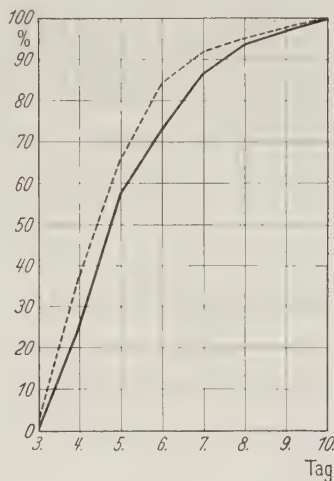


Abb. 16

Abb. 15. Prozent Keimung bei der Nachkeimung, Ernte 1957. — $l \cdot v$; — — — $l_{ch} \cdot v_{ch}$

Abb. 16. Der Keimverlauf bei den Samen der Ernte 1957. — $l \cdot v$, 194 gek. Sa. = 24,6 %; — — — $l_{ch} \cdot v_{ch}$, 594 gek. Sa. = 62,4 %. Die Versuche vom 24. 11. und 1. 12. 58 zusammengefasst

Abnahme der Keimung und hernach wieder die langsame Zunahme zu einem 2. Maximum am 4. 3. 59. Dies ist auch bei den Versuchen mit Samen des Jahres 1956 erkennbar. Das hier weniger ausgeprägte Minimum liegt bei beiden Samensorten früher, nämlich am 22. 1. 59. Eine Beziehung zwischen der so auffallend guten Keimung bei den 2×10 Std-Versuchen vom 5.—22. 1. 59 und der Nachkeimung ist nicht erkennbar. Interessant ist, daß bei den ersten

beiden 3×10 Std.-Versuchen die Samen schlechter nachkeimten, obwohl sie zuvor stärker belichtet worden waren. Da bei den Versuchen mit den Samen von 1956 nichts Derartiges zu beobachten ist, könnte eine noch nicht abgeschlossene Nachreife der Grund dafür sein.

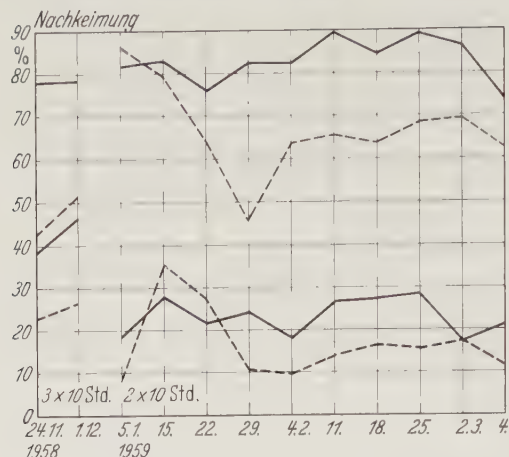


Abb. 17. Prozent Keimung bei den 3×10 Std.- und 2×10 Std.-Versuchen und bei der Nachkeimung.
— $l-v$, Ernte 1956. --- $l-v$, Ernte 1957

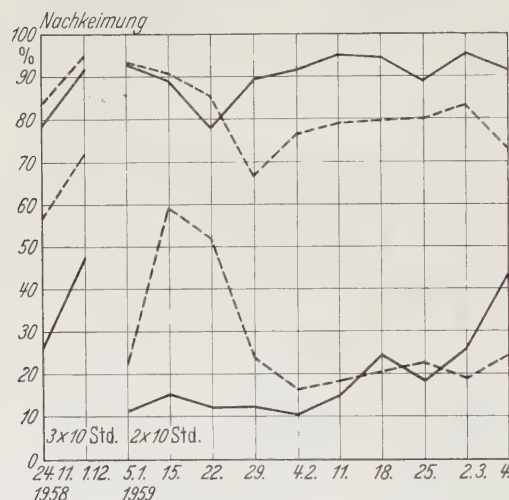


Abb. 18. Prozent Keimung bei den 3×10 Std.- und 2×10 Std.-Versuchen und bei der Nachkeimung.
— $l_{ch} \cdot v_{ch}$, Ernte 1956.
--- $l_{ch} \cdot v_{ch}$, Ernte 1957

geschlossene Nachreife der Grund dafür sein.

Was den Keimverlauf anbetrifft, so keimten bei den 3×10 Std.-Versuchen die $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen des Jahres 1957 schneller als die $l-v$ -Samen der gleichen Ernte (Abb. 16). Bei den Samen der Ernte 1956 war es umgekehrt gewesen (Abb. 13). In den 2×10 Std.-Versuchen ist erstaunlicherweise kein Unterschied in der Keimgeschwindigkeit der $l_{ch} \cdot v_{ch}$ - und $l-v$ -Samen vorhanden. Es wurde deshalb auf eine Abbildung verzichtet.

Auch für die Nachkeimung war der Keimverlauf verfolgt worden. Dabei keimten in jedem Fall die $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen schneller als die $l-v$ -Samen, die Samen d. J. 1956 schneller als die d. J. 1957. Das ist verständlich, da ja aus beiden Ernten die Samen der $l_{ch} \cdot v_{ch}$ die höheren Keimprozentage in der Nachkeimung aufwiesen. Die langsamere Keimung der Samen d. J. 1957 gegenüber denen d. J. 1956 dürfte wohl eine Folge der noch nicht ganz abgeschlossenen Nachreife sein.

Vergleichen wir nun noch einmal abschließend die Versuche mit den Samen der beiden Ernten 1956 und 1957. Zu diesem Zweck sind in Abb. 17 die Keimprozentkurven für die $l-v$ -Samen aus den beiden Jahren zusammen gezeichnet worden.

Man sieht nun, daß die $l-v$ -Samen d. J. 1957 — mit Ausnahme der Versuche vom 15. und 22. 1. 59 — schlechter gekeimt haben als die d. J. 1956. Da wir auch bei der Nachkeimung der Samen d. J. 1957 auffallend niedrige Keimprozentage haben, möchte man annehmen, daß die noch nicht abgeschlossene Nachreife der Grund dafür ist. Die gute Keimung bei den Versuchen vom 5. und 15. 1., die etwa die gleiche Höhe wie bei den Samen von 1956 erreicht, spricht aber gegen diese Annahme. Die fast gleiche Lage der Keimungsmaxima und

-minima bei den Samen aus den beiden Jahren würden eher auf eine jahresperiodische Schwankung in der Lichtabhängigkeit der Keimung hinweisen (s. auch BÜNNING 1949 u. 1951), die jedoch bei den älteren Samen nicht mehr so ausgeprägt ist. Auch die ziemlich große Übereinstimmung des Verlaufs der Kurven der 2×10 Std.-Versuche mit denen der Nachkeimung trotz der unterschiedlichen Versuchsbedingungen erhärtet diese Annahme.

Wie ist es nun bei den Versuchen mit den $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen? In den 3×10 Std.-Versuchen keimten die Samen d. J. 1957 viel besser als die d. J. 1956 (Abb. 18). Da die Nachkeimung bei beiden Samensorten etwa gleich war, sind also die Samen von 1957 weniger lichtbedürftig. Bei den $l \cdot v$ -Samen war es gerade umgekehrt gewesen. In den 2×10 Std.-Versuchen keimten die jüngeren Samen bis zu dem am 11. 2. angesetzten Versuch durchweg besser. Auch hier fallen die Versuche vom 15. und 22. 1. mit den $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen d. J. 1957 durch ihre hohen Keimprozente heraus wie diejenigen mit $l \cdot v$ -Samen des gleichen Jahres. Bei den Versuchen vom 18. und 25. 2. sind wir gewissermaßen an dem Umkehrpunkt, denn in den letzten beiden Versuchen keimten die Samen d. J. 1956 besser als diejenigen d. J. 1957, wie das bei den $l \cdot v$ -Samen zumeist der Fall gewesen ist. Bei der Nachkeimung fällt auf, daß in den ersten 5 Versuchen kaum Unterschiede vorhanden sind. Dann sinkt aber die Keimung der Samen d. J. 1957 in Übereinstimmung mit den $l \cdot v$ -Samen des gleichen Jahres zu dem Minimum vom 29. 1. ab, um von da an durchweg schlechter zu bleiben als bei den Samen d. J. 1956. Daß wider Erwarten die Lichtabhängigkeit der $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen d. J. 1957 geringer ist als die der Samen d. J. 1956, könnte möglicherweise darauf zurückzuführen sein, daß die Reifebedingungen in den beiden Jahren verschieden waren.

Überblicken wir nun noch einmal alle Versuche, über die in der vorliegenden Arbeit berichtet wurde, so können wir feststellen, daß ein einziger Faktor, in diesem Fall der die chlorina-Färbung bedingende Faktor ch , die Lichtbedürftigkeit der Samen bei der Keimung abzuändern vermag. Dabei ist es nicht gleichgültig, in welchem genotypischen Milieu er sich befindet. Wenn wir allerdings die Keimung der $B_{ch} \cdot l_{ch}$, $v_{ch} \cdot I_{ch}$ und $l_{ch} \cdot v_{ch}$ -Samen im Vergleich zu derjenigen der $B \cdot l$, $v \cdot I$ und $l \cdot v$ -Samen untersuchen, so erfassen wir gewissermaßen nur die Resultante der Wirkung des Faktors ch in dem einen sowie in dem anderen Komplex. Unter Umständen braucht diese Wirkung in den beiden Komplexen aber gar nicht gleichsinnig zu sein. Es wäre daher von Interesse, die Wirkung des Faktors ch in den verschiedenen Komplexen jeweils für sich zu erfassen und miteinander zu vergleichen. Durch geeignete Kreuzungen kann das für diese Frage notwendige Material erhalten werden. Über die noch anzustellenden Versuche wird später berichtet.

Zusammenfassung

1. Der die chlorina-Färbung bedingende, mutativ entstandene Faktor ch ändert in charakteristischer Weise die Lichtbedürftigkeit der Samen bei der Keimung.

Die Samen der hellgrünen *Oenothera Berteriana* ($B_{ch} \cdot l_{ch}$) sind weniger lichtbedürftig als die der Normalform ($B \cdot l$). Auffallenderweise ist es bei der hellgrünen *Oe. odorata* ($v_{ch} \cdot I_{ch}$) gerade umgekehrt. Ihre Samen sind stärker lichtbedürftig als diejenigen der $v \cdot I$.

2. Durch den Faktor *ch* wird der Keimverlauf in jedem Fall beschleunigt.

3. Auch die Nachreife der Samen ist bei den *chlorina*-Formen gegenüber den Normalformen verändert. Auch dabei ist es nicht gleichgültig in welchem genotypischen Milieu sich der Faktor *ch* befindet.

4. Die Befunde der Versuche mit Samen der $l \cdot v$ und $l_{ch} \cdot v_{ch}$ aus den Jahren 1956 und 1957 sind widersprechend. Sie lassen sich unter der Annahme verstehen, daß der Faktor *ch* die altersbedingte Änderung der Lichtbedürftigkeit der Samen anders steuert.

Literatur

- BORRIS, H.: Über die inneren Vorgänge der Samenkeimung und ihre Beeinflussung durch Außenfaktoren. Jb. wiss. Bot. **89**, 254—337 (1941).
- BÜNNING, E.: Zur Physiologie der endogenen Jahresrhythmik in Pflanzen, speziell in Samen. Z. Naturforsch. **4b**, 167—176 (1949).
- BÜNNING, E., u. L. MÜSSE: Der Verlauf der endogenen Jahresrhythmik in Samen unter dem Einfluß verschiedenartiger Außenfaktoren. Z. Naturforsch. **6b**, 108—112 (1951).
- HAUSTEIN, E.: Die Mutante *chlorina* der *Oenothera Berteriana*. Ber. dtsh. bot. Ges. **69**, 143—148 (1956).
- PIRSON, H.: Die Mutante B · *l* hellgrün. Diss. Erlangen 1951.
- SCHWEMMLE, J.: Keimversuche auf genetischer Grundlage. I. Die Lichtabhängigkeit. Planta (Berl.) **54**, 294—313 (1960).

Prof. Dr. J. SCHWEMMLE, Botanisches Institut der Universität, Erlangen

From the Department of Microbiology, Yale University, New Haven (Conn.), USA

REVERSE MUTATIONS AND ENZYME HETEROGENEITY*

By

KARL ESSER, JOHN A. DE MOSS and DAVID M. BONNER

With 2 Figures in the Text

(Received June 16, 1960)

I. Introduction

Mutations which restore wild type phenotype are called reversions, and in microorganisms, reversions are in general judged in nutritional terms, i.e., mutation from auxotrophy to prototrophy. However, it remains an open question whether all such reversions represent the restoration of the exact original phenotype at the molecular level. An answer to this question should provide a better understanding of the structure and the function of the gene. For this purpose, it is necessary to compare as precisely as possible the gene product of revertants to the original wild type gene product.

This question has been investigated and in several cases differences in the quantitative level of enzyme activity in individual revertants derived from a single mutant have been found (PATEMAN 1957, GILES 1958, STADLER and YANOF-SKY 1959). In certain instances, it has been clearly demonstrated that specific revertants possess restored enzymes which are qualitatively altered but these studies have provided no indication of the frequency of occurrence of altered enzymes among revertants (MAAS and DAVIS 1952, FINCHAM 1957, GILES 1958, YANOF-SKY and CRAWFORD 1959, GAREN 1960). It was felt that the examination of a number of revertants, derived from a single mutant strain, for the distribution of qualitative alterations in enzyme properties would provide meaningful information about the phenomenon of reversion.

Tryptophan synthetase from *Neurospora crassa* is well suited for such an analysis. The *td* locus which controls the formation of this enzyme has been studied in detail. Additionally, the enzyme catalyzes three different reactions which makes possible a comparison of revertants in three different catalytic activities (YANOF-SKY 1952, YANOF-SKY and RACHMELER 1958, DEMOSS and BONNER 1959).

- (1) Indole-3-glycerol phosphate + serine \rightarrow tryptophan + triose phosphate,
- (2) Indole + serine \rightarrow tryptophan,
- (3) Indole-3-glycerol phosphate \rightleftharpoons indole + triose phosphate.

Of the many *td* mutants studied which have lost the ability to form tryptophan, all are incapable of catalyzing reaction (1), which appears the physiologically important reaction in *N. crassa*. However, certain mutants form altered enzymes which retain the ability to catalyze either reaction (2) (RACHMELER and YANOF-SKY 1959) or reaction (3) (DEMOSS and BONNER 1959).

* This work was supported in part by an Atomic Energy Commission grant, Contract AT (30—1) 1017 and in part by a grant from the National Science Foundation, G-9881. Funds for travel for one of us (K. E.) were provided by the United States Educational Commission in the Federal Republic of Germany.

The *td* mutants can also be distinguished by immunological analysis since about half of the 200 mutants studied form a cross reacting material (*CRM*) which is immunologically related to the tryptophan synthetase of the wild type (SUSKIND *et al.* 1955, LACY 1959).

Other differences which have been studied among the *td* mutants are temperature sensitivity (SUSKIND and KUREK 1952) suppressibility (YANOFSKY and BONNER 1955) and sensitivity to Zn^{++} (SUSKIND and KUREK 1957).

In studies on the genetic substructure of the *td* locus, it has been shown that the mutants involve different mutational sites within this locus (YANOFSKY and BONNER 1955). These sites are linearly arranged (LACY 1959, SUYAMA and BONNER in press). Within this linear arrangement the different biochemical classes fall in distinct areas (SUYAMA and BONNER in press).

In the present studies a series of revertants from the mutant *td*₂ has been analyzed. *td*₂ forms an altered enzyme which catalyzes reaction (3) only and reacts as *CRM*. The following data, which are based on an analysis of the three different biochemical reactions and the immunological reaction of tryptophan synthetase, show significant differences among the restored enzymes of the revertants.

II. Materials and Methods

Wild type strains 74A, 74A-*ori-8a*, 113A, 119A, 114a and 136a were used. The latter four were isolated from different crosses between *td* mutants and 74A or 74-*ori-8a*. The 25 revertants were derived from *td*₂ a by UV radiation. Each revertant was backcrossed to *td*₂ A to exclude the possibility that wild type behavior was attributable to a heterocaryotic state. Suppressor mutations which affect the *td* locus in *N. crassa* have been found invariably to produce strains which grow much slower than the wild type on minimal medium. It was therefore, considered highly unlikely that any revertant which exhibits a growth rate equivalent to the wild type would possess enzyme activity as a result of presence of a suppressor gene. In these studies, all the revertants examined were shown to grow at the same rate as the wild type using the "race tube" method of RYAN *et al.* (1943). In addition, the possibility that the low activity of revertant 6, is due to a suppressor separate from the *td* locus was ruled out by the results of tetrad analyses of a cross of revertant 6 to the wild strain.

All strains were grown in minimal medium (VOGEL 1956) in Fernbach flasks for 48 hrs at 30° C on a rotary shaker. Mycelia were harvested by filtration through cheesecloth, washed twice with distilled water and pressed between filter paper to remove excess water. If not immediately used, this preparation was stored at -15° C.

For preparation of extracts the pressed mycelia were frozen in liquid nitrogen for 10 min and then crushed in the Hughes Press (HUGHES 1951). The crushed mycelium was thawed in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.8, at a ratio of 1:4 (weight:vol). The brei was centrifuged at 20,000 x g for 20 min and the supernatant was used as the crude extract. Protein content of the crude extract was always approximately 10 mg/ml.

In order to concentrate the activity fractionation procedures were carried out as previously described (DEMOSS and BONNER 1959). The partially purified extract contained 50-80 mg of protein per ml.

Reaction (1) was determined by the appearance of tryptophan, using the following reaction mixture: 50 micromoles phosphate buffer, pH 7.8, 80 micromoles DL serine, 0.2 micromoles indolglycerol phosphate (InGP), 0.25 micromoles glutathione, 0.08 micromoles pyridoxal phosphate (B6P) in a final volume of 1 ml. After incubation at 37° C 0.25 ml. of 10% trichloroacetic acid was added to each tube to stop the reaction and to precipitate the proteins. The sample was centrifuged 20 min in a clinical centrifuge and a 1 ml. aliquot of the supernatant was removed and, after the addition of 0.5 ml 4N NaOH, were heated for 30 min in a boiling water bath to hydrolyze the remaining InGP. Indole was then extracted by shaking the tubes vigorously with 4 ml of toluene. One ml of the aqueous layer was acidified with 0.15 ml of a 10 N sulfuric acid and tryptophan was then determined by the following

modification of a method developed by KUPFER (personal communication). Two ml of a 30 N sulfuric acid containing 60 mg/ml p-diemethylaminobenzaldehyde were added to each sample and the mixture cooled in an ice bath. Then 0.05 ml of 0.025% NaNO_2 was added with immediate mixing and the mixture was incubated for 40 min at room temperature to allow maximum color development and finally read in a Zeiss spectrophotometer at 580 $\text{m}\mu$. Optical density readings obtained with standard tryptophan were linear from 0.05 micromole to 0.3 micromole and 0.1 micromole tryptophan reads about 100.

Reaction (2) was determined by indole disappearance (YANOFSKY 1955). The reaction mixture was similar to that of reaction (1) except that it contained 0.5 micromole indole instead of InGP.

For the measurement of reaction (3) indole appearance was determined by the same procedure as in reaction (2) using the following reaction mixture: 50 micromole phosphate buffer, pH 7.8, 0.2 micromole InGP in a final volume of 1 ml. Incubations were also carried out in the presence of 0.08 micromole B6P or 40 micromole L-serine or both.

Cross reacting material (CRM) was measured according to the methods of SUSKIND (1957). Any material which reacts with and neutralizes antibodies formed in response to wild type tryptophan synthetase is referred to as CRM. This terminology is used for convenience and does not imply immunological identity.

Protein was determined with the folin reagent (LOWRY *et al.* 1951).

III. Results

1. Enzyme and CRM analyses in wild type strains

A detailed examination of the characteristics of the wild type enzyme was performed initially to establish a basis for comparison of wild type and revertant enzymes and also to test the reproducibility of the procedures. Four cultures of wild type strain 74A were grown, fractionated and analyzed for reaction (1), (2), (3) and CRM (Table 1). These operations were performed simultaneously under identical conditions.

Table 1. Enzyme and CRM determination of 4 preparations of wild type strains 74A. 1 unit of CRM is defined as that amount of material which will neutralize the amount of antibody needed to inhibit 1 $\mu\text{M}/\text{h}$ of reaction (2) of wild type enzyme

Reaction ($\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg pr.}$)						CRM units/ $\text{h}/\text{mg pr.}$	Ratios		
1	2	3					2/1	1/ CRM	2/ CRM
		addition of							
		—	B6P	Serine	Serine B6P				
0.219	0.602	$1.62 \cdot 10^{-4}$	0	0	0	0.475	2.75	0.46	1.27
0.239	0.686	$4.03 \cdot 10^{-4}$	$1.27 \cdot 10^{-4}$	0	0	0.659	2.87	0.36	1.04
0.199	0.504	$2.04 \cdot 10^{-4}$	$1.11 \cdot 10^{-4}$	0	0	0.446	2.53	0.45	1.13
0.178	0.493	$1.57 \cdot 10^{-4}$	$0.62 \cdot 10^{-4}$	0	0	0.437	2.77	0.41	1.13

It may be seen from table 1 that the levels of enzyme activities, as well as CRM, vary considerably in the four preparations. On the other hand the ratios between these activities and CRM are fairly constant. The expression of the enzyme properties in relative values apparently overcomes the variability found in the absolute values and provides a more valid basis for comparison of different extracts. The activities found for reaction (3) are extremely low and have not been included in the calculations of the ratios. However, the inhibition of reaction (3) of the wild type enzyme by B6P, serine of both is clearly demonstrated as previously reported (DEMOSS and BONNER 1959).

It was felt that if the ratios between the enzyme reactions and *CRM* provide a truly valid basis for comparison, they should not be significantly altered by different genetic backgrounds. To test this assumption, a number of wild type strains, which are not isogenic and representing both mating types, were analyzed

Table 2. Ratios of enzyme reactions and *CRM* for various wild strains of different mating types

Mating type	Number of strains	Number of prep.	Ratios (means with $3 \times$ standard error)		
			2/1	1/ <i>CRM</i>	2/ <i>CRM</i>
A	3	8	2.46 ± 0.36	0.46 ± 0.12	1.13 ± 0.27
a	3	7	2.52 ± 0.50	0.49 ± 0.12	1.19 ± 0.18

by the same procedures (Table 2). Strains of both mating types were included.

The overlapping of the deviations of the means for the two mating types indicates that the ratios are not affected by the alternative mating types.

Furthermore, the relatively small variability found in each group seems to exclude any effect due to other unknown genetic differences among the different wild types.

The constancy of the ratios between the enzyme reactions and *CRM* indicates that these ratios can be used as an appropriate basis for comparison of revertants and wild strains.

2. Enzyme and *CRM* analyses in revertants

The 25 revertants were analyzed for reactions (1), (2), (3) and *CRM* (as described in the methods). With 13 of the revertants the complete procedure was repeated

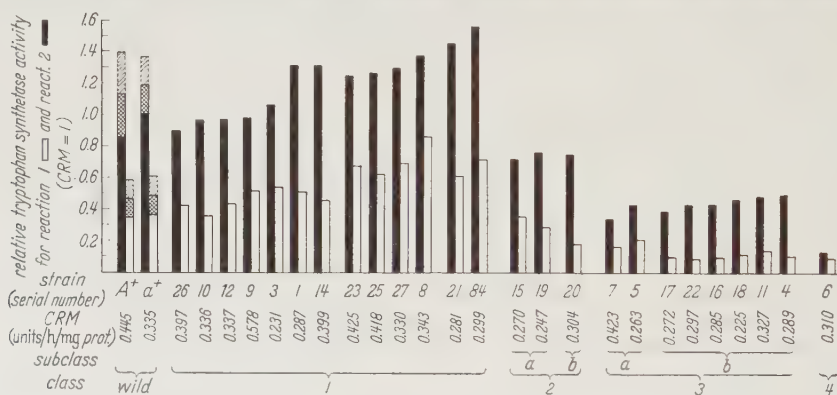


Fig. 1. Graphical presentation of the results of the assays of enzyme reaction (1) and (2) in relation to *CRM*, which is arbitrarily designated as 1. The absolute amount of *CRM* in units/h/mg pr. is given below the strain no. below the bars. For both the wild types the $3 \times$ standard error is given by the cross-hatched parts of the bars

and in each case reproduced the initial results within the limits of experimental error. The absolute levels of enzyme activity and *CRM* showed a similar variability as found in the different wild strains. Therefore, the data are presented as relative values in figure 1 where the amount of *CRM* is arbitrarily designated as 1. For comparison the data obtained for the A and a wild strains from table 2 have been included.

As mentioned previously reaction (3) was extremely low and is therefore not included in the graph. Since, as opposed to reaction (3) of the wild strain, the reaction (3) of *td*₂ is stimulated

by B6P (DeMoss and Bonner 1959), the response of this reaction to the addition of B6P was examined in each of the extracts and used as an additional criterion for comparison.

The revertants evidently can be divided into two major groups with respect to ratio of reaction (2) to *CRM*. The ratios of the first group fall within the range of three times the standard errors of the ratios of the wild strains or have a slightly greater ratio (class 1). The strains of the second group have distinctly lower ratios (class 2, 3, and 4). The two groups can be further distinguished with respect to the effect of B6P on reaction (3). In the strains of the first group, reaction (3) is strongly inhibited by B6P. Reaction (3) in strains of the second group is only slightly inhibited, uninhibited or stimulated in the presence of B6P.

For a further analysis of the two major groups, the data given in figure 1 were subjected to statistical analysis (Table 3). Only the last six strains in class 1 appeared to fall outside of the wild type range (strains 23, 25, 27 and 28 for the ratio of reaction (2) to *CRM*; strains 21 and 84 for the ratios of both reaction (1) and (2) to *CRM*). However, the statistical analysis of these subgroups show that they are not significantly different from the wild strains (see table 2 and 3). Therefore, all the strains of the first major group are considered to be a single class (class 1) which does not statistically differ from the wild type.

The second group can be divided with respect to the ratio of reaction (2) to *CRM* into three subgroups which are statistically different (classes 2, 3 and 4). Relative to the wild strains, the ratios are 75% in class 2, 43% in class 3, and 13% in class 4 (strain 6 was analyzed four times). Therefore, *on the basis of the ratio of reaction (2) to CRM, the 25 revertants fall into four statistically different classes.*

A further tentative classification can be made on the basis of the ratios of reaction (2) to (1). In class 2, strain 20, and in class 3, strains 17, 22, 16, 18, 11 and 4, show a significantly higher value for this ratio (4.0) than the ratios found in class 1 and in the wild strains (2.5). Although some variability was found for

Table 3. *Statistical analyses of the data given in figure 1. The means are presented with the three times standard error*

Revertant strain	Ratio		Class	Ratio Reaction 2/ Reaction 1	sub classes	Action of B6P in Re- action 3	
	Reaction 1/ <i>CRM</i>	Reaction 2/ <i>CRM</i>					
26 10 12 9 3 1 14 23 25 27	0.46 ± 0.07	1.07 ± 0.19	1	2.43 ± 0.41	none	strong Inhibition	
8 21 84		0.71 ± 0.16		1.29 ± 0.09			1.84 ± 0.16
		0.66 ± 0.14		1.50 ± 0.16			2.30 ± 0.16
15 19 20	0.27 ± 0.15	0.75 ± 0.04	2	2.38 ± 0.10	a	slight or no inhibition or stimulation	
7 5 17 22 16 18 11 4				4.16	b		
6	0.09	0.13	3	2.40 ± 0.70	a		
				4.04 ± 0.65			b
			4	1.53	none		

this ratio in class 1, no significant differences exist which would allow a further division in this class. The only revertant representing class 4 has an extremely low ratio (1.5) for reaction (1) to (2). On the basis of the ratios of reaction (2) to (1) classes 2 and 3 have been provisionally divided into two subclasses *a* and *b*.

IV. Discussion

Backmutations or reversions have been frequently utilized to study the phenomenon of mutation without examination of the enzymic properties of specific revertants. Many papers dealing with the analyses of reversion have not been primarily concerned with the problem of whether each revertant which exhibits the wild phenotype, also corresponds exactly to the wild type in its enzyme properties.

GILES (1958) has examined this problem in some detail. In his studies on the *ad*₄ locus of *N. crassa* it was found that revertants obtained by both UV and X-ray irradiation fell into several restricted groups based on quantitative levels of the corresponding enzyme, adenylosuccinase. Unfortunately, no data were presented to demonstrate the confidence limits of these groups.

More recently WOODWARD, PARTRIDGE and GILES (1960) have presented evidence that the differences found in quantitative

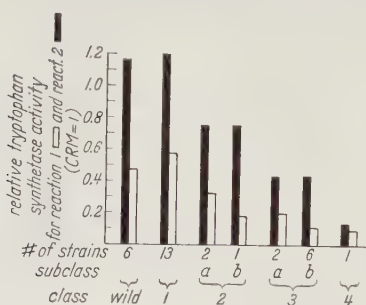


Fig. 2. Graphical presentation of the 6 different groups which are found after analysis of enzyme and CRM in 25 revertants from the mutant *td*₃ in *N. crassa*. The figures below the bars represent the numbers of revertants attributed to each class

enzyme levels may actually reflect qualitative differences as judged by properties such as substrate activation, stability in various buffers and sensitivity to inhibitors. This is in agreement with the suggestion by STADLER and YANOFSKY (1959) that quantitative enzyme differences observed in revertants in *E. coli* at the *td* locus may be due to restoration of enzymes which are qualitatively altered. In both cases, however, a comprehensive survey of all the revertants based on the criteria mentioned was not presented.

In the present studies it was found that a great variability existed in the specific activities of tryptophan synthetase in different strains as well as different preparations of the same strain and, as a result, it was not possible to arrange the revertants into restricted quantitative groups with any confidence.

One revertant, found by GILES to exhibit an altered specificity for the two substrate of adenylosuccinase, demonstrated a unique category of revertants without invoking the quantitative level of the enzyme. Since a number of parameters involving specific enzyme properties are measurable in the tryptophan synthetase system, it has been possible to group the *td* revertants solely on this basis into four main classes with two additional subclasses as summarized in figure 2.

Class 1 corresponds to wild type but the other three major classes differ significantly from the wild type behavior in the ratio of reaction (2) to CRM. In all classes, the ratio of reaction (2) to (1) remains the same as wild type, except in the case of classes 2b and 3b, where

reaction 1 is relatively low, and revertant 6 which has been separated as class 4. In the latter case, an extremely low enzyme specific activity was always apparent in the extracts as well as the very low enzyme activities to *CRM* ratios.

A first conclusion which can be drawn from these findings is that *the high amount of enzyme formed in wild type is not necessary for normal growth* since even revertant 6 exhibits growth rate equivalent to wild type.

The next question to be considered is what biochemical significance can be attributed to the differences in enzyme activities relative to *CRM* activities found in the various groups? Because of the nature of the assay for *CRM*, the ratio of reaction 2 to *CRM* is one in the wild type. Are the deviations from unity for this ratio found in classes 2, 3 and 4 attributable to quantitative or qualitative enzyme differences?

A quantitative difference requires the existence of two molecular entities, one *CRM* and the other enzyme with wild type characteristics, and their production in varying proportions in the revertant classes. This possibility seems unlikely since all evidence to date indicates that in wild type extracts *CRM* is identical to tryptophan synthetase and in mutants lacking the enzyme, *CRM* represents an altered product of the mutant gene.

Therefore, it seems highly probable that *the differences found among the revertant classes are due to qualitatively altered enzymes*.

How can such qualitative enzyme differences be explained as a result of backmutation? If these categories truly represent altered enzymes then there must exist in the case of these revertants at least four and possibly six alternate enzyme configurations which catalyze wild type reactions. From this, it follows that at least the same number of alternate gene configurations must be responsible for the restoration of such activity. When current coding theories are considered (LEVINTHAL 1959), it seems unlikely that this many gene configurations could arise as the result of backmutations at a single point. The *possibility that reversion may arise as a result of mutation at some other point within the locus* has long been considered. Such a phenomenon might be called „*intragenic suppression*“. It is tempting to suggest that intragenic suppression accounts for one or more of the revertant groups observed.

This working hypothesis is supported by the following preliminary experiments. Revertant 84 (class 1) and revertant 6 (class 4) were subjected to forward mutation by treatment with UV.

Of 15 tryptophan auxotrophs obtained from revertant 84, 5 were *td* mutants, 9 grew on indole and 2 on anthranilic acid, which is the usual pattern found in mutant hunts with the wild type. None of the 5 *td* mutants were indole accumulators. Among the 89 tryptophan auxotrophs from revertant 6, 87 were *td* mutants and two grew on indole. 12 of the *td* mutants were indole accumulators like *td₂*.

Since indole accumulators occur rarely among *td* mutants obtained from the wild type (approximately 2 in 100), it is understandable that such mutants were not found among the tryptophan auxotrophs derived from revertant 84. The fact that 14% of the *td* mutants from revertant 6 were indole accumulators may best be explained by the hypothesis of intragenic suppression as follows: a further forward mutational step might be expected to produce a high proportion of *td₂* types since the *td₂* mutation would be expressed when the intragenic suppressor was lost by mutation.

Thus, these data, clearly point to the fact that probably a number of revertant classes will be found; and the interpretation of the existence of these classes in terms of the coding problem necessitates the development of adequate methods for studying and mapping intragenic suppressors.

Summary

The *td* locus of *Neurospora crassa* has been utilized to investigate whether reverse mutation restores the exact enzyme properties of the parental strain as well as its wild phenotype. This locus controls the formation of the enzyme tryptophan synthetase which catalyzes three different reactions. In addition, the enzyme protein may be determined by immunological procedures.

Some tryptophanless mutants form an immunologically related protein (*CRM*) which is apparently an altered tryptophan synthetase. From one such *CRM* forming mutant, *td*₂, 25 UV induced revertants exhibiting the wild type growth rate were selected and analyzed for the three enzyme reactions and for *CRM*.

Absolute levels of each reaction and *CRM* were variable in different preparations but a detailed analysis of six different wild strains showed that the ratios between the enzyme reactions and *CRM* were constant. These ratios were, therefore, used as a basis for examining the revertant and wild strain properties.

The ratios of enzyme activities to *CRM* indicate that the revertants fall into four significantly different classes. The first class (13 revertants) corresponds to wild type but the other three classes differ significantly from the wild type behavior. Classes 2 and 3 could be further divided into two subclasses by the differences in the ratio of reaction (1) to (2).

The reasons are discussed for attributing the differences found among the revertant classes to qualitative rather than quantitative alterations of the enzyme. It is proposed that the number of revertant classes obtained is not easily explained on the basis of backmutation at a single point and that "intragenic suppression" may account for some of the revertants. Preliminary experiments are cited which support this hypothesis.

Acknowledgments. The authors wish to express their appreciation to Mrs. Delilah Gomes for her invaluable assistance.

Bibliography

- DEMOSS, J. A., and D. M. BONNER: Studies on normal and genetically altered tryptophan synthetase from *Neurospora crassa*. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 1405—1412 (1959).
FINCHAM, J. R. S.: A modified glutamic dehydrogenase as a result of gene mutation in *Neurospora crassa*. Biochem. J. **65**, 721—728 (1957).
GAREN, A.: Genetic control of the specificity of the bacterial enzyme, alkaline phosphatase. In Microbial Genetics, X Symp. Soc. Gen. Microbiol., ed. by W. Hayes and R. C. Clowes, pp. 239—247. London 1960.
GILES, N. H.: Mutations at specific loci in *Neurospora*. Proc. X. Intern. Cong. of Genetics, Vol. 1, pp. 261—279, Montreal 1958.
HUGHES, D. E.: A press for disrupting bacteria and other microorganisms. Brit. J. exp. Path. **32**, 97—109 (1951).
LACY, A.: Genetic analysis of the *td* locus in *Neurospora crassa*. Thesis, Yale University, New Haven (Conn.) 1959.
LEVINTHAL, C.: Coding aspects of protein synthesis. Rev. Mod. Physics **31**, 249—255 (1959).

- LOWRY, O. H., M. ROSENBOUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* **193**, 265—275 (1951).
- MAAS, W. K., and B. D. DAVIS: Production of an altered pantothenate-synthesizing enzyme by a temperature-sensitive mutant of *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **38**, 785—797 (1952).
- PATEMAN, J. D.: Back mutation studies at the *am* locus in *Neurospora crassa*. *J. Gen.*, **55**, 444—455 (1957).
- RACHMELER, M., and C. YANOFSKY: Biochemical and genetic studies with a new *td* mutant type in *Neurospora crassa*. *Bact. Proc.* p., 30 (1959).
- RYAN, F. J., G. W. BEADLE and E. L. TATUM: The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. *Amer. J. Bot.* **30**, 784—797 (1943).
- STADLER, J., and C. YANOFSKY: Studies on a series of tryptophan-independent strains derived from a tryptophan-requiring mutant of *Escherichia coli*. *Genetics* **44**, 105—123 (1959).
- SUSKIND, S. R.: Properties of a protein antigenically related to tryptophan synthetase in *Neurospora crassa*. *J. Bact.* **74**, 308—318 (1957).
- SUSKIND, S. R., and L. I. KUREK: Enzyme-inhibitor complex in a tryptophan-requiring mutant of *Neurospora crassa*. *Science* **126**, 1068—1069 (1957).
- SUSKIND, S. R., C. YANOFSKY and D. M. BONNER: Allelic strains of *Neurospora crassa* lacking tryptophan synthetase: A preliminary immunochemical characterization. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 577—582 (1955).
- WOODWARD, D. O., W. A. PARTRIDGE and N. H. GILES: Studies of adenylosuccinase in mutants and revertants of *Neurospora crassa*. *Genetics*, **45**, 535—554 (1960).
- YANOFSKY, C.: The effect of gene change on tryptophan desmolase formation. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **38**, 215—266 (1952).
- YANOFSKY, C.: Tryptophan synthetase from *Neurospora*. In: *Methods in Enzymology*, vol. 2, pp. 233—238. New York 1955.
- YANOFSKY, C., and D. M. BONNER: Gene interaction in tryptophan synthetase formation. *Genetics* **40**, 761—769 (1955).
- YANOFSKY, C., and M. RACHMELER: The exclusion of free indole as an intermediate in biosynthesis of tryptophan in *Neurospora crassa*. *Biochim. biophys. Acta* **40**, 640—641 (1958).
- YANOFSKY, C., and I. P. CRAWFORD: The effects of deletions, point mutations, reversions and suppressor mutations on the two components of tryptophan synthetase *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)* **45**, 1016—1026 (1959).

Dr. KARL ESSER, Privatdozent,
Botanisches Institut der Universität Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Dr. JOHN A. DE MOSS, Assistant Professor,

Dr. DAVID M. BONNER, Professor of Microbiology
Dept. of Microbiology, Yale University, New Haven/Conn., USA

Kurze Mitteilung

Aus der Abteilung für Mikrobiologie des Botanischen Instituts der Universität Köln

DAS VERHALTEN NITRITINAKTIVierter T1-PHAGEN IN KREUZUNGS- UND MULTIPLIZITÄTSREAKTIVIERUNGS-VERSUCHEN

Von

THOMAS A. TRAUTNER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. August 1960)

Die inaktivierende und mutationsauslösende Wirkung von salpetriger Säure ist seit der ursprünglichen Entdeckung von MUNDY und GIERER (1958) am TMV auch an Bakterien (KAUDEWITZ 1959) und Bakteriophagen (VIELMETTER und WIEDER 1959) beobachtet worden. In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche berichtet, die zeigen, 1. daß sich Nitrittreffer rekombinationserhöhend auswirken, 2. daß mit nitritinaktivierten T 1-Phagen Multiplizitätsreaktivierung auftritt.

Inaktivierungen. T 1-Phagen wurden in 0,1 m NaNO_2 in 0,25 m Azetatpuffer pH 4,8 bei 30° C inaktiviert. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von VIELMETTER und WIEDER (1959) an T 2 und SAUERBIER (1960) an T 1 verlaufen die Überlebenskurven nitritbehandelter Phagen in halblogarithmischem Maßstab

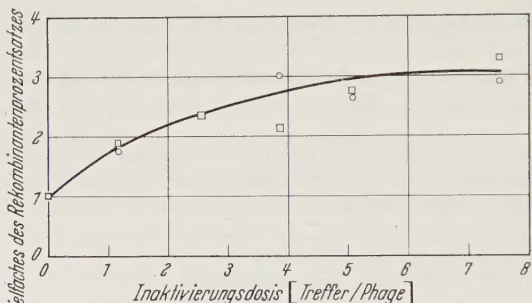


Abb. 1. Vielfaches des Rekombinantenprozentsatzes bei der Nitritdosis 0 aufgetragen gegen die Anzahl der Nitrittreffer der Parentalphagen (2 Versuche)

(etwa 5%) aber reproduzierbar von der des Wildtyps ab. Es wird angenommen, daß sich hierin eine unterschiedliche Empfindlichkeit der für die Adsorption oder Injektion der betreffenden Phagen verantwortlichen *Proteine* widerspiegelt. Für diese Annahme spricht der Befund, daß derartige Unterschiede vorwiegend zwischen solchen Phagen zu beobachten sind, die sich in ihrem Wirtsbereich unterscheiden.

Kreuzungen. Zu einem Experiment wurden immer 6 Kreuzungen vom Typ $Ge^+Ds \times GeDs^+$ mit verschieden stark nitritinaktivierten Phagen entsprechend der für T 1-Kreuzungen benutzten Technik (TRAUTNER 1960a) durchgeführt. In allen Versuchen konnte ein Anstieg der Rekombinantenprozentsätze mit zunehmender Nitritdosis auf die Parentaltypen beobachtet werden. Die Ergebnisse von 2 Versuchen sind in Abb. 1 zusammengefaßt. Hier ist das Vielfache des Rekombinantenprozentsatzes bei der Dosis 0 aufgetragen gegen die Inaktivierungsdosis, wobei als Einheit diejenige Dosis gewählt wurde, die e^{-1} -Phagen überleben läßt (im Mittel ein Treffer pro Partikel).

linear. Diese Kinetik gilt für T 1 jedoch nur bis zu etwa 6—7 Zehnerpotenzen Inaktivierung. Bei weiterer Nitriteinwirkung wird häufig eine Abnahme der Inaktivierungsrate beobachtet. Dieser Effekt kann dem Auftreten von Multiplizitätsreaktivierung bei der Plattierung zugeschrieben werden. Die Neigungen der Inaktivierungskurven verschiedener T 1-Mutanten weichen schwach

Wie zu erkennen ist, wirken sich Nitrittreffer — analog UV-Treffern (JACOB und WOLLMAN 1955, TRAUTNER 1956) — innerhalb des berücksichtigten Dosisbereiches rekombinationserhöhend aus.

Diese Rekombinationserhöhung kann bei den benutzten Infektionszahlen und Inaktivierungen nicht zurückgeführt werden auf Zellen, die von überlebenden Phagen mischinfiziert wurden. Aus dem vorliegenden Versuchsergebnis kann somit geschlossen werden, daß ein großer Teil nitritinaktivierter Phagen in der Lage sein muß, ihre DNS zu injizieren und sich an Rekombinationsprozessen zu beteiligen.

Multiplizitätsreaktivierung (MR). MR von nitritinaktiviertem T 4 wurde bereits von HARM (1960) nachgewiesen.

Eine Untersuchung der MR von T 1 erschien interessant für eine weitere Klärung der Virus-Wirtsbeziehung dieses Phagen: Nach Versuchen von GAREN und ZINDER (1955) wird für T 1 eine Wechselwirkung zwischen Bakteriengenom und vegetativem Phagen angenommen. Diese führt z. B. bei Infektion unbehandelter Bakterien mit UV-bestrahlten Phagen zur Wirtsreaktivierung eines Teils der UV-Schäden. Nach Versuchen von TESSMAN und OZAKI (1957) verdeckt diese Wirtsreaktivierung die MR UV-inaktivierter T 1-Phagen, was dadurch gezeigt werden konnte, daß MR solcher Phagen nachzuweisen war auf Bakterien, deren Reaktivierungsfähigkeit z. B. durch UV-Bestrahlung geschädigt wurde.

Gilt die Tessmansche Deutung für das Nichtauftreten von MR bei UV-inaktiviertem T 1, sollten nitritbehandelte Phagen, deren Schäden, wie SAUERBIER (1960) gezeigt hatte, *nicht* wirtsreaktivierbar sind, MR bei Plattierung auf unbehandelten Bakterien zeigen.

Die Ergebnisse von 2 Versuchen sind in Abb. 2 dargestellt. Als Phage wurde hier T 1 *HaDs*

Abb. 2. Multiplizitätsreaktivierung nitritinaktivierter Phagen. Gestrichelte Kurve: Monokomplexe; ○—○ MR Kurve für die Infektionszahl $1,4 \pm 10\%$; ×—× MR Kurve für die Infektionszahl $3,2 \pm 10\%$. Die Multikomplexeurven sind für Monokomplexe korrigiert

Abb. 3. Abnahme der Wirtszellen-Tötungsfähigkeit nitritinaktivierter Phagen. Gestrichelte Kurve: Phageninaktivierung

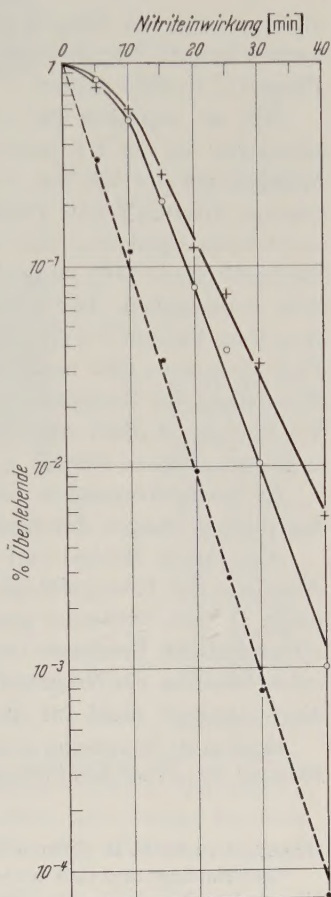


Abb. 2

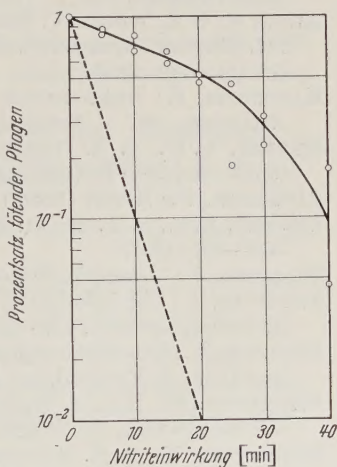


Abb. 3

(= D 20) (TRAUTNER 1960 b) benutzt, als Bakterium der Wirtstamm SF. Dieses System hatte gegenüber T 1 den technischen Vorteil, daß durch das Vorhandensein eines Phagenantiseraums 1. die Infektionszahl, 2. die Zelltötungsfähigkeit

nitritinaktivierter Phagen aus einer Titration überlebender Bakterien bestimmt werden konnte. Die gleichen Ergebnisse wie in Abb. 2 dargestellt, wurden mit den Phagen T 1 *wild* erhalten.

MR ist demnach für nitritbehandelte Phagen T 1, wenn auch erheblich schwächer als für T 4, nachzuweisen. Der beobachtete Effekt stellt jedoch den Minimalwert der MR dar, weil Multikomplexe nicht korrigiert wurden für etwaige Nitrittreffer im Protein. Könnten derartig geschädigte Phagen ihre DNS nicht mehr injizieren, wäre die effektive Infektionszahl der Komplexe *niedriger*, die beobachtete MR, zu beziehen auf die korrigierte Infektionszahl, größer als in Abb. 2 angegeben. Der Anteil der im Protein zu lokalisierenden Nitrittreffer betrug beim Phagen T 4 (HARM 1960) $\frac{1}{6}$, wurde von VIELMETTER und SCHUSTER für PLT 22 zu etwa 15% bestimmt und dürfte bei T 1 in der gleichen Höhe sein. Eine Ermittlung der Proteinschäden aus der Wirtstötungsfähigkeit nitrit-inaktivierter T 1-Phagen ist nicht ohne weiteres zwingend, da es möglich ist, daß T 1-Phagen injizieren ohne zu töten.

In Kontrollversuchen, die unter identischen Versuchsbedingungen mit UV-bestrahlten Phagen durchgeführt wurden, konnte keine MR beobachtet werden.

Aus diesem Befund und der im Verhältnis zur Inaktivierungsrate schwachen Abnahme der Tötungsfähigkeit von Phagen bei zunehmender Nitritinaktivierung (Abb. 3) kann wiederum gefolgert werden, daß sich nitritinaktivierte Phagen an intrazellulären Prozessen beteiligen können. Während hinsichtlich der Phagenrekombination ein Nitrittreffer einem UV-Treffer formal gleichzusetzen war, gilt diese Analogie nicht für die Wirtsreaktivierbarkeit.

Fräulein H. MODERSOHN danke ich für technische Assistenz. Die Arbeit wurde mit Unterstützung der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“ durchgeführt.

Literatur

- GAREN, A., and N. D. ZINDER: Radiological evidence for partial genetic homology between bacteriophage and host bacteria. *Virology* **1**, 347—376 (1955).
- HARM, W.: Vergleichende Untersuchungen an HNO_2 -inaktivierten und UV-inaktivierten Bakteriophagen T 4. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 52—62 (1960).
- JACOB, F., et E. WOLLMAN: Etude génétique d'un bactériophage tempéré d'*Escherichia coli*. III. Effect du rayonnement ultraviolet sur la recombinaison génétique. *Ann. Inst. Pasteur* **88**, 724—749 (1955).
- KAUDEWITZ, F.: Inaktivierende und mutagene Wirkung salpetriger Säure auf Zellen von *Escherichia coli*. *Z. Naturforsch.* **14b**, 528—537 (1959).
- MUNDRY, K. W., u. A. GIERER: Die Erzeugung von Mutationen des Tabakmosaikvirus durch chemische Behandlung seiner Nukleinsäure. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 614—640 (1958).
- SAUERBIER, W.: *Nature* (Lond.) (1960, im Druck).
- TESSMAN, E. S., u. T. OZAKI: Multiplicity reactivation of bacteriophage T 1. *Virology* **4**, 315—327 (1957).
- TRAUTNER, T.: Unveröffentlichte Ergebnisse 1956.
- TRAUTNER, T.: The influence of multiplicity of infection on crosses with bacteriophage T 1. *Z. Vererb.-Lehre* **91**, 259—265 (1960).
- TRAUTNER, T.: Genetische und physiologische Beziehungen zwischen den Bakteriophagen T 1 und D 20. *Z. Vererb.-Lehre* (1960, im Druck).
- VIELMETTER, W., u. C. M. WIEDER: Mutagene und inaktivierende Wirkung salpetriger Säure auf freie Partikel des Phagen T 2. *Z. Naturforsch.* **14b**, 312—317 (1959).
- VIELMETTER, W., u. H. SCHUSTER: Die Basenspezifität bei der Induktion von Mutationen durch salpetrige Säure im Phagen T 2. *Z. Naturforsch.* **15b**, 304—311 (1960).

THOMAS A. TRAUTNER,

Botanisches Institut der Universität, Abtlg. für Mikrobiologie
Köln-Lindenthal a. Rh., Gyrhofstraße 15